Thèses
de Doctorat d'Etat
N° d'ordre 128

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Raymonde CAMAIN née GIABICANI

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY (MENTION PHARMACIE)
MAITRE-ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE DAKAR

PREMIÈRE THÈSE

Recherches sur l'action des azides des acides pyridine-monocarboxyliques sur les protides

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 12 octobre 1963 devant la Commission d'Examen.

MM.	L. GENEVOIS	PRÉSIDENT
	P. CREAC'H	EXAMINATEURS
	J. BARAUD	
	E. NEUZIL	MEMBRE INVITÉ

THÈSES

PRÉSENTÉES À LA

FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
- LEIDEN -

Thèses
de Doctorat d'Etat
N° d'ordre 128

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Raymonde CAMAIN née GIABICANI

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY (MENTION PHARMACIE)
MAITRE-ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE DAKAR

PREMIÈRE THÈSE

Recherches sur l'action des azides des acides pyridine-monocarboxyliques sur les protides

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 12 octobre 1963 devant la Commission d'Examen.

MM. L. GENEVOIS — PRÉSIDENT
P. CREAC'H — EXAMINATEURS
J. BARAUD — EXAMINATEURS
E. NEUZIL — MEMBRE INVITÉ

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

MM.

Doyen :

BRUS

Professeurs honoraires :

DAURE	Professeur à la Sorbonne
KASTLER	Professeur à la Sorbonne
QUELET	Professeur à la Sorbonne
PISOT	Professeur à la Sorbonne
M[lle] JOSIEN	Professeur à la Sorbonne

Professeurs :

DANGEARD	Botanique
GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale
MILLOUX	Calcul infinitésimal
CAU	Physique expérimentale
BRUS	Chimie
AVEL	Zoologie et Physiologie animale
ROUSSET	Physique générale
ROGER	Mécanique rationnelle
WEILL	Anatomie comparée et embryogénèse
DUFRESNOY	Mathématiques générales
LAFON	Physiologie générale
BOUNHIOL	Biologie animale
SERVANT	Physique
CALAS	Chimie organique
GAY	Minéralogie
LAMARE	Géologie (remplacé par M. EMBERGER, Maître de Conférences)
PACAULT	Chimie physique
SCHOELLER	Géologie
DAVID	Biologie végétale
COLMEZ	Méthodes mathématiques de la Physique.
CAMBAR	Biologie animale
VIGNEAUX	Géologie
PANOUSE	Zoologie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
ARZELIES	Physique (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
RIBEREAU-GAYON	Œnologie et chimie agricole
RISS	Mathématiques (détaché à l'Institut Français au Maroc)
GUIZONNIER	Physique
DIEUZEIDE	Biologie générale
HAGET	Zoologie expérimentale
SEMIROT	Astronomie
CHASTEL	Physique nucléaire
HAGENMULLER	Chimie minérale
ALLARD	Chimie
CREAC'H	Biologie animale S.P.C.N.
LOUDETTE	Mécanique physique
PATY	Chimie

Bordes	Préhistoire
Sechet	Botanique
Lafargue	Physique (C.S.U. de Pau)
Baganas	Mathématiques
Valentin	Radioélectricité
Ennouchi	Géologie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
Eyme	Botanique
Frainnet	Chimie organique
Ruamps	Physique électronique
Deschamps	Chimie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
Hoarau	Chimie physique
Lalande	Chimie appliquée
Mauret	Chimie organique (C.S.U. de Pau)
Marchand	Chimie
M^me^ Tison	Calcul des probabilités
Gottis	Géologie approfondie
Lemanceau	Chimie
Clastre	Cristallographie physique
Blonder	Mathématiques
Sourisseau	Chimie M.P.C. - S.P.C.N.
Joussot-Dubien	Chimie M.P.C. - S.P.C.N.
Mayer	Physique (C.S.U. de Pau)
M^lle^ Faure-Muret	Géologie (détachée à la Faculté des Sciences de Rabat)
M^me^ Pambrun-Vincent	Zoologie (détachée à la Faculté des Sciences de Rabat)
M^lle^ Laffitte	Physique M.G.P.
Roch	Physique
Lochet	Physique
Valade	Chimie organique
Vindt	Biologie végétale
Régnier	Mathématiques
Destriau	Chimie
Petit	Physique corpusculaire

Maître de Conférences honoraire :

De Puymaly

Maîtres de Conférences :

Baraud	Chimie biologique
Bonnevay	Physique théorique
Bothorel	Chimie
Cardo	Psycho-physiologie
Clin	Géologie
Simonoff	Chimie physique
Charru	Physique M.P.C.
Bonastre	Chimie (C.S.U. de Pau)
Lascombe	Chimie
Rimpault	Mathématiques
Vinh Mau	Physique théorique
Barets	Biologie animale
Berthe	Mathématiques (C.S.U. de Pau)
Dubois	Physique (C.S.U. de Pau)
N	Mathématiques

Conseiller administratif :

Artiguelong

A mes parents

A mon mari

A mes enfants

Monsieur L. GENEVOIS

Professeur de Chimie biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux

nous a fait l'honneur de juger notre travail et de présider notre jury.

Qu'il veuille bien croire à notre profonde reconnaissance.

Monsieur P. CREAC'H

Professeur de Biologie animale à la Faculté des Sciences de Bordeaux

Monsieur J. BARAUD

Maître de Conférences de Chimie biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux

ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Qu'ils trouvent ici tous nos remerciements.

Monsieur E. NEUZIL

Professeur de Biochimie médicale à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

nous a fait le plaisir de se joindre à Messieurs les membres du jury de la Faculté des Sciences et d'argumenter ce travail après l'avoir inspiré.

Témoignage de notre gratitude.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué à Dakar dans les laboratoires de Biochimie médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie sous la direction de Monsieur le Professeur NEUZIL et de Chimie physique de la Faculté des Sciences sous la direction de Monsieur le Professeur BROCHE.

Monsieur le Professeur NEUZIL nous a inspiré ce travail et nous a dirigée au cours de son exécution; par la suite, malgré son retour en France, il a continué à suivre notre expérimentation et à nous prodiguer ses conseils.

Monsieur le Professeur BROCHE a été pour nous un guide précieux dans la partie physicochimique de ces recherches dont notre thèse, plus spécialement orientée sur le plan biochimique, ne reflète qu'une partie.

Monsieur le Professeur BOUDET a grandement facilité notre tâche.

A ces Maîtres va toute notre gratitude.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Docteur MASSEYEFF, Maître de Conférences agrégé à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Dakar, successeur de Monsieur le Professeur NEUZIL au laboratoire de Biochimie; à Monsieur le Professeur BOIRON de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Dakar; à Monsieur le Médecin Commandant MATTERN Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Dakar, pour les conseils éclairés et l'aide inappréciable qu'ils nous ont apportés. Nous pensons aussi aux services rendus par les Docteurs CASTETS et GOMBERT de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Dakar. Je ne saurais oublier Madame J. FREGIERS, qui nous a secondée pendant trois ans, alliant à d'excellentes qualités techniques, une affabilité jamais mise en défaut.

INTRODUCTION

Connue depuis 1866, date à laquelle GRIESS [85] isole le phénylazide, la chimie des azides ne prend cependant une extension considérable qu'à la fin du XIX^{e} siècle grâce à CURTIUS [45 à 51] et DIMROTH [58-59], qui montrent que ces composés s'avèrent des agents de synthèse remarquables.

Si DIMROTH s'attache tout spécialement à étudier le groupe des arylazides, CURTIUS au contraire s'intéresse surtout aux acidylazides. De cette époque et grâce à CURTIUS date la première utilisation des azides dans la chimie des protides [51]. C'est en effet au début du XX^{e} siècle que les chercheurs commencent à se préoccuper de la synthèse des peptides. FISCHER [71] venait de préciser que la formation d'une liaison peptidique dépend principalement de l'« activation » du groupement α-carboxylique ou du groupement α-aminé de l'aminoacide. A la technique d'activation du groupement carboxylique par transformation en chlorure correspondant décrite par FISCHER, CURTIUS substitue une méthode où le groupement carboxylique entre en jeu après passage par l'ester, l'hydrazide puis par l'azide correspondant.

Il est remarquable de constater qu'à l'heure actuelle où la chimie des peptides a fait des progrès spectaculaires en particulier dans le domaine hormonal, la méthode de Curtius aux azides reste toujours une méthode de choix. En 1938 et dans un but très différent, CLUTTON [38] s'inspire de la technique de Curtius pour introduire dans une protéine un groupement chimique déterminé.

L'étude des protéines modifiées a pris en effet un essor considérable depuis une trentaine d'années. Les protéines natives présentent dans leur molécule des groupements chimiques libres, de nature différente, qui confèrent à ces substances une large réactivité. La modification des protéines naturelles par de très nombreux agents possédant une action plus ou moins spécifique a conduit non seulement à de nombreuses applications analytiques (détermination des acides aminés terminaux) ou industrielles (tannage, fabrication de matières plastiques) mais a permis également, sur un plan plus théorique, de déterminer la nature de structures responsables de l'activité hormonale [172, 36] et enzymatique [95-94]. Ces recherches se sont montrées particulièrement fructueuses dans le domaine de l'immunologie : à la suite des travaux de LANDSTEINER [113], on connaît le rôle précis d'un grand nombre de groupements chimiques dans la manifestation des pouvoirs antigène et anticorps.

Parmi les modifications ainsi apportées à la molécule de protéine, l'introduction d'hétérocycles n'a fait jusqu'ici l'objet que d'un nombre assez réduit de travaux [66, 11, 65, 126, 127, 88, 98, 156, 39] en particulier en ce qui concerne le noyau de la pyridine [12, 114, 10, 137]. Cependant depuis leur découverte, les composés pyridiques ont toujours été étroitement liés à la matière vivante, puisque les produits nauséabonds qu'obtenait déjà au XII^{e} siècle Alfred VON VILLANOSA par distillation sèche du sang humain, contenaient une proportion notable de dérivés pyridiques. La pyridine n'est pourtant isolée qu'en 1849 par ANDERSON [4] à partir du goudron de houille. Dès cette époque GERHARDT en montrant l'analogie qui existe entre le noyau pyridique et celui de la quinoléine qui est à la base de la structure de nombreux alcaloïdes, place les composés pyridiques parmi les produits d'intérêt biologique.

Les investigations biochimiques des années ultérieures justifient l'intérêt que l'on porte à ces dérivés. Fait peu connu que signale GENEVOIS dans une récente revue générale [76], l'acide nicotique est isolé dès 1912 par FUNK et DRUMMOND de la couche à aleurone du blé et du riz, sans que ces auteurs n'établissent de lien entre cet acide et le

facteur préventif de la pellagre, affection que le biochimiste Funk considérait déjà à cette époque comme une avitaminose. Ce point ne devait être élucidé qu'en 1937 par Elvehjem. Entre temps, Otto Warburg montrait que l'amide de l'acide nicotique constituait l'élément essentiel de deux transporteurs d'hydrogène, le DPN et le TPN.

Le noyau pyridique est retrouvé également dans les facteurs vitaminiques B_6 dont le principal, à l'état de phosphate, constitue un coenzyme intervenant dans de nombreuses réactions du métabolisme protidique.

L'hétérocycle pyridique fait partie intégrante de nombreux médicaments mais l'histoire de l'utilisation thérapeutique des dérivés pyridiques marque un véritable tournant avec l'année 1945.

C'est en effet à cette époque que Chorine [35] découvre l'activité inhibitrice in vivo et in vitro de la nicotamide sur *Mycobacterium tuberculosis*. La confirmation de ses propriétés tuberculostatiques par Kushner et Mc Kenzie [112, 121] amène les chercheurs à préparer un certain nombre de dérivés possédant en commun le noyau pyridique et conduit les équipes de Grunberg [87] et de Berstein [15] à mettre en évidence l'activité si marquée de l'hydrazide *iso*nicotique sur le bacille tuberculeux, déterminant ainsi une révolution dans l'histoire de la tuberculose.

Tous ces fait nous ont incitée à nous intéresser à la série pyridique, et plus particulièrement aux azides des acides pyridine-monocarboxyliques dont la chimie ainsi que l'interférence en biochimie étaient très peu connues ou même totalement inabordées.

Notre travail est divisé en trois chapitres.

Dans le chapitre I seront exposés la préparation des azides des acides pyridine-monocarboxyliques et un résumé de nos travaux sur l'étude de leurs propriétés physico-chimiques.

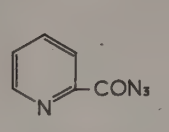
Le chapitre II est relatif à l'action des azides sur les acides aminés. Nous étudierons en premier lieu l'action des azides sur la fonction amine elle-même. Nous envisagerons ensuite la synthèse et quelques propriétés de divers N-*iso*nicotylaminoacides. Des essais bactériologiques termineront ces recherches.

Le chapitre III se rapporte à l'étude des protéines substituées par l'intermédiaire de ces azides : leur préparation, le dosage de la quantité de résidus pyridiques fixés, les modifications physico-chimiques de ces protéines, la détermination des groupements chimiques de la protéine qui entrent en jeu, l'influence de la substitution sur les propriétés antigéniques et le pouvoir anticorps, l'activité enzymatique de la protéine native seront successivement examinés.

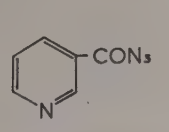
CHAPITRE I

PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS DES AZIDES DES ACIDES PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUES

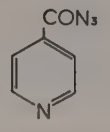
Nous devons à CURTIUS et MOHR [49] la première préparation d'un azide d'acide pyridine-monocarboxylique. C'est en effet en 1898 que les auteurs réalisent à Kiel la synthèse de l'azide de l'acide nicotique (*), par les stades classiques de l'acide, de l'ester et de l'hydrazide. Les azides isomères, correspondant aux acides picolique et *iso*nicotique, ont été obtenus plus tard à Prague, en 1912, par MEYER et MALLY [125].



azide picolique



azide nicotique



azide *iso*nicotique

Ces azides n'ont jamais fait l'objet d'études systématiques. Quelques auteurs [72, 149, 75, 178] utilisent bien les trois isomères, mais sans essayer d'isoler les azides qui ne jouent qu'un rôle d'intermédiaire pour la préparation d'autres substances chimiques.

Les premières recherches à leur sujet datent de 1959 [140]. Une équipe japonaise s'intéresse à la décomposition de ces azides dans l'acide acétique et le toluène, à diverses températures; dans ces conditions en effet, les azides subissent la transposition de Curtius et se transforment en isocyanates selon la réaction :

$$R-C(=O)-N_3 \rightarrow R-N=C=O+N_2$$

Les mesures de la vitesse de réaction, effectuées en déterminant la quantité d'azote dégagée, montrent que la réaction répond à la loi du premier ordre.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature, que nous avons examinée systématiquement jusqu'en décembre 1962, d'autres travaux sur ces composés dont, en définitive, les caractères physicochimiques sont peu connus.

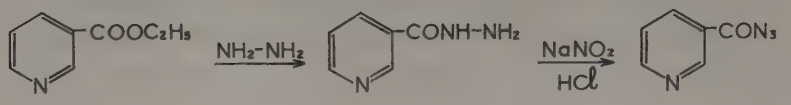
Nous nous sommes efforcée de combler cette lacune. Il nous a semblé en particulier intéressant d'étudier les propriétés qui pouvaient amener quelques éclaircissements sur l'action des azides sur les protéines [132].

Dans notre premier chapitre, nous développerons tout d'abord le mode de préparation des azides des acides pyridine-monocarboxyliques. Nous décrirons ensuite les spectres de ces substances et les expériences que nous avons réalisées sur l'hydrolyse de ces composés en milieu aqueux.

(*) Il existe 3 acides pyridine-carboxyliques isomères, que l'on peut appeler les acides pyridine α—, β— et γ— carboxyliques, ou encore les acides pyridine 2—, 3— ou 4— carboxyliques. Leurs noms usuels sont, respectivement, les acides picolique, nicotique et *iso*nicotique ; cette terminologie est la terminologie classique française recommandée en particulier dans le traité de GRIGNARD [165] ; c'est celle que nous avons adoptée. De nombreux auteurs les appellent les acides picolinique, nicotinique et *iso*nicotinique; il semble que cette nomenclature soit d'origine anglo-saxonne.

I. — PRÉPARATION DES AZIDES PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUES

Curtius [49] préparait l'azide nicotique par action, en milieu chlorhydrique et à basse température, de l'acide nitreux sur l'hydrazide correspondant. Ce dernier était obtenu en faisant agir l'hydrate d'hydrazine sur l'ester éthylique de l'acide nicotique :



Nous avons adopté ce mode opératoire pour les trois isomères.

Signalons que l'hydrazinolyse peut être également réalisée à partir de l'amide : c'est de cette manière que Fox et Field [72] passent de la nicotamide à l'hydrazide nicotique.

Nos produits de départs sont :

— l'hydrazide picolique; nous avons préparé nous-même cet hydrazide à partir du picolate d'éthyle (Flucka, Buchs, Saint-Gall) en ajoutant de l'hydrate d'hydrazine à 95 p. 100 à l'ester dans la proportion de 10 g pour un dixième de molécule d'ester. Le mélange est chauffé à reflux au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. L'hydrazide cristallise par refroidissement. Il est essoré soigneusement, lavé avec de l'eau froide et de l'alcool, et purifié par recristallisation dans l'alcool. $F = 100°$. Le rendement est de 50 p. 100.

— l'hydrazide nicotique; nous l'avons également préparé nous-même à partir du nicotate de méthyle (Raschig, Ludwigshaffen a/Rhein) par la technique précédente; le rendement est de 85 p. 100; $F = 158°$.

— l'hydrazide *iso*nicotique; il s'agit de l'isoniazide, tuberculostatique fabriqué à l'heure actuelle en grande quantité par l'industrie pharmaceutique (*). $F = 171{,}4°$.

Les azides sont synthétisés selon le protocole suivant :

A 1,37 g d'hydrazide (1/100 de molécule dissous dans 3,5 ml d'HCl dilué, refroidi au bain de glace) sont ajoutés lentement et en agitant 2 ml d'une solution très concentrée de nitrite de sodium (75 g p. 100). La température doit se maintenir en dessous de 5°. La concentration de la solution acide varie suivant l'hydrazide. Nous avons utilisé une solution d'HCl ($d = 1{,}19$) au demi pour l'hydrazide *iso*nicotique, au tiers pour l'isomère α et dans la proportion de deux parties d'HCl pour une partie d'eau pour le dérivé β, car les hydrazides γ et surtout α reprécipitent en solution acide trop concentrée. Le rendement est meillcur avec des solutions très acides. Il est préférable de travailler en milieu homogène de façon à éviter les surchauffes locales au moment de l'addition d'acide, surchauffes auxquelles sont particulièrement sensibles les azides qui se décomposent rapidement sous l'action de la chaleur.

Le mélange est ensuite neutralisé à $pH = 7{,}00$ avec une solution de carbonate de sodium à 20 p. 100 préalablement refroidie, puis extrait à l'éther ; si cette neutralisation n'était pas effectuée, l'azide se décomposerait rapidement en acide au cours de l'extraction éthérée. L'éther, lavé avec la solution de carbonate de sodium, puis deux fois avec l'eau distillée, est desséché sur $CaCl_2$ et enfin évaporé sous vide en présence de P_2O_5 et à la température ambiante.

Le rendement global de notre préparation est de 50 p. 100 pour l'azide picolique, de 70 à 80 p. 100 pour le dérivé β et de 60 p. 100 pour le dérivé γ.

(*) Nous devons ce produit à l'amabilité du Docteur Blau, des laboratoires Hoffman La Roche, Paris; nous l'en remercions bien vivement.

Les azides étant des produits peu stables et s'altérant facilement, nous n'avons donc cherché à obtenir, dans de rares cas, que de petites quantités utilisables dans les vingt-quatre heures après mise en dessiccateur sur P_2O_5.

Les azides picolique et nicotique se présentent sous la forme de cristaux blancs fondant respectivement à 39-40° et à 47-48° (détermination au microscope à point de fusion) (*). Ils sont solubles dans l'eau (surtout le dérivé α) et dans le dioxanne. L'azide *iso*nicotique qui, au moment de l'évaporation de l'éther est un solide blanc, fond quelques minutes après sa sortie du dessicateur; il se présente alors comme un liquide huileux, de coloration légèrement jaune, due probablement à des impuretés, telles que des oxydes d'azote. Cet aspect a été signalé par certains auteurs [28, 75, 178]. Carrara [28] cependant constatait une cristallisation spontanée au bout de quelques jours : nous n'avons jamais pu l'observer. L'azide *iso*nicotique est insoluble dans l'eau, mais soluble dans le dioxanne.

Nous avons fait une tentative de purification par le procédé utilisé par Yukawa et Tsuno [179] pour un certain nombre de benzazides substitués. Le résidu est repris par l'alcool à 90°. On ajoute de l'eau jusqu'à ce que la solution se trouble. Le mélange est refroidi et le produit se sépare par cristallisation. Dans le cas particulier du dérivé γ, les cristaux qui se forment s'avèrent être des cristaux d'acide *iso*nicotique confirmant ainsi l'instabilité de l'azide *iso*nicotique.

Nous insistons tout particulièrement sur les précautions à prendre au cours de la préparation des azides de la série pyridique, qui se sont montrés être des substances toxiques, surtout dans la série β et γ. Comme ces azides sont volatils, toutes les manipulations doivent être réalisées sous une hotte bien ventilée. Il faut éviter tout contact des azides avec la peau et les muqueuses (**).

II. — SPECTRES D'ABSORPTION DES AZIDES DANS L'ULTRA-VIOLET

Nous avons déterminé, dans la région ultra-violette, les spectres des azides des acides pyridine-monocarboxyliques dans le double but :

— de rechercher une base expérimentale dans l'étude cinétique de l'hydrolyse de ces composés;

— d'interpréter la structure électronique de ces azides.

Nous exposerons tout d'abord les résultats obtenus, puis nous en ferons une brève interprétation.

A. — DESCRIPTION DES SPECTRES

Nous avons étudié comparativement l'absorption spectrale de l'azide et celui de l'acide à partir duquel il a été préparé; cet acide correspond d'ailleurs également à son produit de décomposition.

Ces spectres ont été déterminés en solution aqueuse contenant une petite quantité de dioxanne nécessaire à la parfaite solubilisation des azides (0,1 ml de dioxanne pour 4 mg d'azide). Le spectre d'absorption des acides pyridine-monocarboxyliques était déjà connu, à la suite des publications de Evans et coll. [67], Jellineck et Urwin. [104], Green et Tong [84], Jacques [101] et Thomas [166] ; cependant nous avons tenu à les déterminer à nouveau dans des conditions expérimentales strictement identiques à celles utilisées pour les azides.

Sur la figure 1, nous avons groupé les courbes relatives aux azides et aux acides des séries α, β et γ.

(*) Marque Reichert.

(**) Nous avons d'ailleurs entrepris, avec M. Giono, Maître de Conférences agrégé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar, une étude pharmacodynamique et toxicologique des azides pyridiques. Ces recherches, qui débordent du cadre de notre travail inaugural, seront publiées par ailleurs.

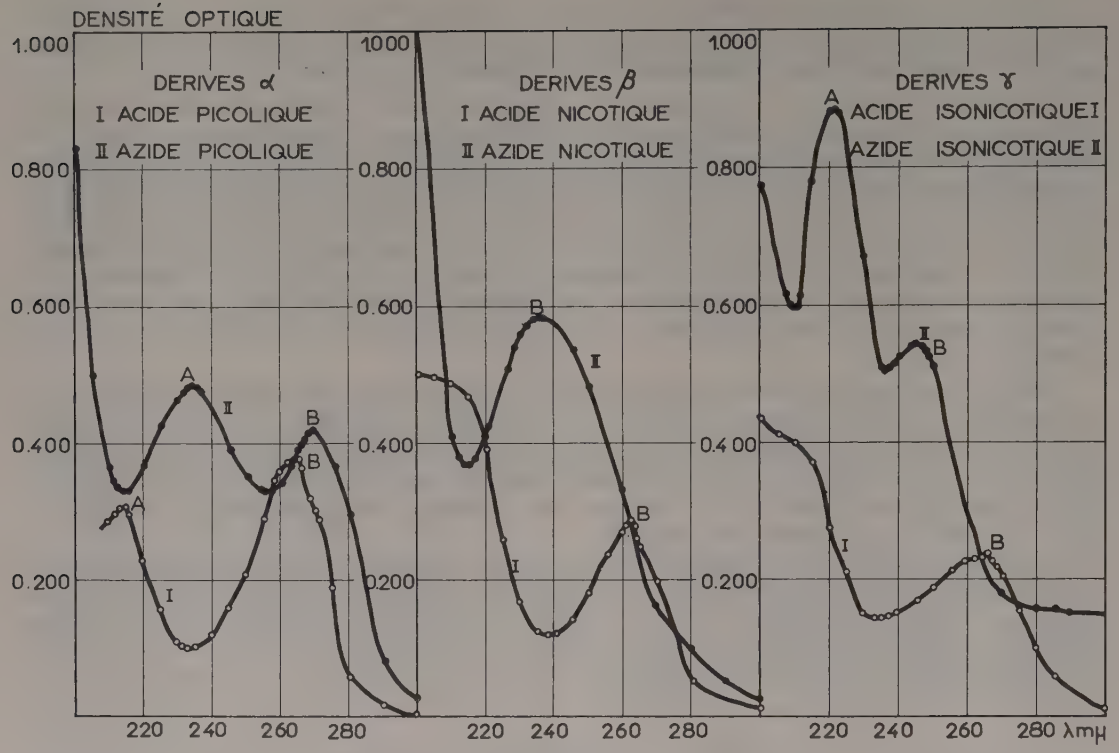


Figure 1.

Spectres d'absorption des azides et des acides pyridine-monocarboxyliques.

Les azides et les acides ont un spectre dans l'ultra-violet totalement différent. D'une manière générale, les trois azides isomères présentent une absorption plus considérable que les acides correspondants dans la région comprise entre 210 et 300 mμ (*).

Si nous étudions chaque isomère en particulier, nous constatons que l'acide picolique montre deux bandes d'absorption caractéristiques : l'une à 215 mμ (bande A), l'autre à 265 mμ (bande B) avec épaulement à 270 — 1 mμ et 259 — 60 mμ. Il semble que nous assistions chez l'azide à un très léger effet bathochrome de la bande B qui déporte le sommet vers les plus grandes longueurs d'onde, c'est-à-dire à 269 mμ. En outre, les épaulements s'effacent. Mais surtout il apparaît un sommet à 234 mμ qui correspond sensiblement au creux qui précède le sommet de la bande B de l'acide. Nous notons aussi une intensité d'absorption très élevée vers 210 mμ qui entraîne la disparition de la bande A.

Cette différence entre acide et azide se retrouve dans les dérivés β. Bien que tous deux n'accusent qu'un massif d'absorption, nous constatons un effet hypsochrome très important qui intéresse le maximum. Ce déplacement vers les plus petites longueurs d'onde amène le sommet de 262 mμ à 235 mμ c'est-à-dire pratiquement au niveau du minimum de l'acide. L'effacement des épaulements de la partie montante (à 235 mμ) et de la partie descendante de la courbe de l'acide (à 270 mμ) est manifeste. Signalons ici encore l'augmentation rapide de la densité optique à partir de 210 mμ.

L'azide γ-pyridine-carboxylique se comporte de manière un peu différente de ses isomères. La courbe montre deux minimums dont l'un n'est que légèrement décalé par

(*) La concentration correspondant aux courbes de la figure 1 est de 8 mg/l pour chaque produit. La concentration moléculaire pour l'acide, $6{,}5 \times 10^{-5}$ mole/l, est donc légèrement plus élevée que celle de l'azide ($5{,}4 \times 10^{-5}$ mole/l).

rapport à celui de l'acide. Lorsqu'on passe du spectre de l'acide à celui de l'azide, l'unique bande du spectre de l'acide qui présente des épaulements à 260 mμ, à 270 mμ et un maximum à 266 mμ, voit les épaulements disparaître, accuse un glissement hypsochrome à 245 mμ et une intensité accrue de son sommet. Il est important de signaler l'apparition d'une deuxième bande dont le maximum à 220 mμ témoigne d'une densité optique très élevée. Cette bande est très proche d'une inflexion que montre la courbe de l'acide vers 210 mμ. Nous notons aussi une remontée de la courbe à partir de 210 mμ.

Désirant utiliser ces résultats pour un dosage spectrophotométrique éventuel des azides, nous avons voulu savoir si les maximums d'absorption relevés suivaient la loi de Beer en fonction de la concentration.

Le graphique de la figure 2 montre qu'il en est bien ainsi.

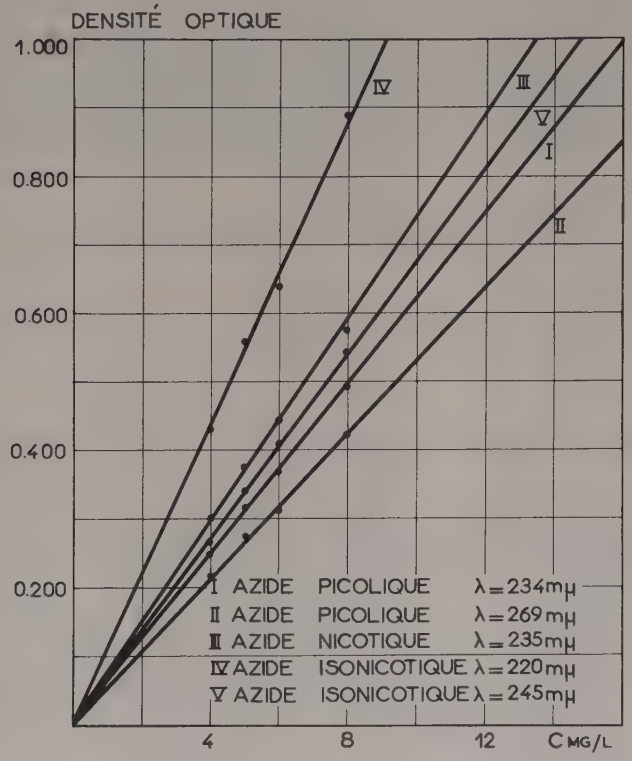


FIGURE 2.

Densité optique des azides pyridine-carboxyliques aux maximums d'absorption.
Etude en fonction de la concentration.
(solution aqueuse à $pH = 6{,}40$).

Nous pouvons donner maintenant le coefficient d'extinction moléculaire pour nos trois azides.

	λ, mμ	$\Sigma \times 10^3$
— azide picolique	234	9,1
	269	7,9
— azide nicotique	235	10
— azide isonicotique	220	16,5
	245	10,0

B. — COMPARAISON AVEC LE SPECTRE D'AUTRES AZIDES

Il nous a semblé intéressant d'étudier dans les mêmes conditions expérimentales des azides plus simples que ceux de la série pyridique. Nous avons groupé dans la figure 3 les spectres de l'azoture de sodium et du benzazide auxquels nous avons joint celui de l'acide benzoïque.

Le spectre que nous considérons comme l'élément de base est celui de l'azoture de sodium ; il a été décrit précédemment [17] : il présente une absorption continue et d'intensité croissante vers les plus faibles longueurs d'onde.

Le benzazide, que nous avons préparé nous-même (cf. partie expérimentale) et dont le spectre n'a jamais été réalisé à notre connaissance (*) accuse un seul maximum très intense à 253 mμ, l'absorption caractéristique du groupement—N_3, comme dans l'azoture de sodium, apparaît spécifiquement vers les faibles longueurs d'onde, dès $\lambda = 220$ mμ.

Le spectre de l'acide benzoïque présente deux bandes, l'une de faible intensité (bande B) dont le maximum se situe à 268 mμ, l'autre (bande A) de plus forte absorption dont le sommet est à 224 mμ. Nos résultats sont en accord avec ceux de Doub et Vandenbelt [61]. Rappelons encore que le benzène présente un maximum d'absorp-

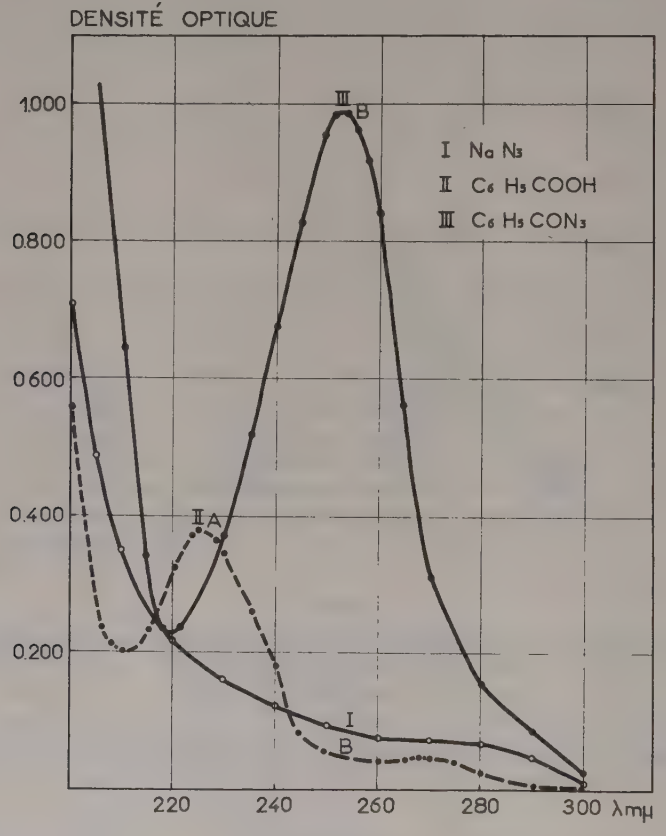


FIGURE 3.

Spectres d'absorption de l'azoture de sodium et du benzazide. (solution aqueuse de $pH = 6{,}40$).

(*) Les spectres d'absorption des nitrobenzazides sont connus [82].

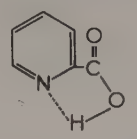
tion principal à $\lambda = 198$ mμ et un centre de structure fine à $\lambda = 255$ mμ [8]. L'introduction dans le noyau benzénique d'un groupement carboxylique détermine donc un effet bathochrome et hyperchrome qui s'exerce sur les deux bandes du benzène [108, 139].

Le remplacement du groupement — OH par le groupement — N_3 modifie totalement le spectre de l'acide.

Il semble se produire une remise en place des bandes du benzène par glissement hypsochrome, la bande A caractéristique disparaissant du fait de son interférence avec l'absorption propre de N_3 et la bande B reprenant sensiblement sa place avec une intensité accrue par rapport à celle du benzène et de l'acide.

Ces comparaisons peuvent se poursuivre dans la série pyridique. Le benzazide ne diffère en effet des azides pyridiques que par le remplacement du groupement azoté hétérocyclique par un groupement carboné. La pyridine présente deux bandes d'absorption, la bande principale A dont le maximum est à 195 mμ et une bande B dont le centre de structure fine est à 250 mμ [8]. Le remplacement d'un H du noyau pyridique par le groupement — COOH s'est traduit, et peut s'interpréter tout comme pour l'acide benzoïque, par un mouvement bathochrome, moins prononcé cependant, des deux bandes de la pyridine dans le cas de l'acide picolique, de la bande B seule pour les dérivés β et γ et par ailleurs une hyperchromicité générale particulièrement sensible dans le cas de l'acide picolique.

Le dérivé α a un comportement particulier qu'Evans et coll. [67] attribuent à l'existence probable d'une liaison H intramoléculaire.



Ce comportement des dérivés α a été étudié par Bruegel [21] au moyen des spectres de résonance magnétique nucléaire.

Dans la série pyridique, le passage des acides aux azides correspondants se manifeste également par des modifications très importantes des spectres, particulièrement pour les dérivés α et γ. Ces modifications sont inhérentes aux interactions du noyau lui-même et du groupe —CON_3, la pyridine ayant en effet des formes bien déterminées de structure de résonance suivant la position du substituant par rapport à l'azote nucléaire. Nous reviendrons sur ces problèmes théoriques d'interprétation physico-chimique dans une publication séparée [25] puisque notre travail est plus spécialement axé vers des aspects biochimiques. Nous donnerons simplement les conclusions ci-dessous.

1° L'introduction du groupement azide dans une molécule se traduit par une augmentation importante de l'absorption dans le domaine des faibles longueurs d'onde. Cette règle est valable pour tous les composés quelque soit le groupement chimique lié au groupement —N_3. Cependant, elle n'explique pas à elle seule les modifications importantes notées par rapport aux substances voisines (comparaison entre azides et acides carboxyliques).

2° Ces modifications seraient directement en rapport avec la possibilité pour le groupement —N_3 d'exister sous plusieurs structures de résonance, comme l'a montré Pauling [142, 171] et comme l'ont vérifié certains auteurs grâce aux spectres de résonance magnétique nucléaire [106].

$$\underset{\text{I}}{-\bar{\bar{N}}=\overset{\oplus}{N}=\overset{\ominus}{\bar{\bar{N}}}} \leftrightarrow \underset{\text{II}}{-\overset{\ominus}{\bar{\bar{N}}}-\overset{\oplus}{N}\equiv\bar{\bar{N}}}$$

Ce sont les interactions entre ces formes de résonance et celles des noyaux aromatiques ou hétéro-aromatiques qui seraient responsables des modifications spectrales.

En effet le remplacement du groupement —N_3 par des groupements —NH_2,

—NH—NH_2, —N(C_2H_5)(C_2H_5) et même par des groupements d'encombrement stérique plus important tels que des résidus d'acides aminés à chaîne plus ou moins longue (voir p. 45) ne modifie que peu les spectres des acides correspondants. Ces substitutions diverses se traduisent par un déplacement du maximum dans des limites très étroites de l'échelle des longueurs d'onde, par mouvement bathochrome ou hypsochrome léger. Mais il ne faut pas oublier que le maximum d'une bande est très sensible, tant au point de vue position qu'au point de vue intensité, en dehors de toute autre considération, aux influences du *p*H [67, 101, 166]. Cette constance relative dans la position d'un maximum montre que les niveaux énergétiques des orbitales moléculaires sur lesquelles circulent les électrons π ne subissent pas dans ces cas précis de modifications importantes.

Il faut donc considérer que le groupement —N_3 est lié à la molécule non comme un simple groupement, mais faisant avec elle un ensemble susceptible de donner naissance à des niveaux énergétiques nouveaux.

Partie expérimentale

Les mesures sont effectuées à l'aide du spectrophotomètre Unicam SP 500 de 200 à 300 mμ avec une lampe à hydrogène et des cuves de silice de 1 cm d'épaisseur, à la température ambiante (22 °C).

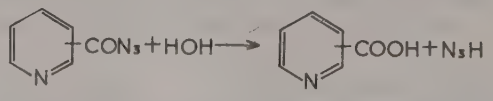
Les techniques de préparation des azides pyridine-monocarboxyliques ont été décrites précédemment. Le benzazide a été préparé selon le procédé de Powell [145] par action d'une solution concentrée aqueuse d'azoture de sodium sur une solution acétonique de chlorure de benzoyle.

Les solutions d'azides et d'acides sont obtenues par dissolution dans l'eau distillée d'une quantité de produit permettant de réaliser une concentration finale de 8 μg au ml. Du fait de l'insolubilité dans l'eau de l'azide *iso*nicotique, et pour permettre une étude strictement comparative des azides et de leurs acides, nous avons été amenée à les traiter au préalable par une très faible quantité de dioxanne (0,1 ml de dioxanne débarrassé des peroxydes pour 4 mg de produit). Nous avons opéré à *p*H = 6,40.

La purification du dioxanne s'effectue de la manière suivante : le produit est traité pendant une heure à reflux avec du chlorure stanneux dans la proportion de 6 g de $SnCl_2$ pour 500 ml de dioxanne. On teste le produit refroidi (2 ml d'une solution de IK à 10 p. 100 additionnés de quelques gouttes d'HCl auxquels est ajouté 1 ml de dioxanne). S'il y a dégagement d'iode, on ajoute $SnCl_2$ par portions de 2,5 g et on traite à reflux pendant une demi-heure chaque fois jusqu'à ce que le test soit négatif, on filtre, on distille au B.M. bouillant sous vide.

III. — ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DES AZIDES EN MILIEU ALCALIN

Dans ses travaux sur les acidylazides, Curtius [45, 48] signale l'hydrolyse de ces composés par les alcalis dilués. Les azides des acides pyridine-monocarboxyliques subissent également une hydrolyse en milieu basique suivant le schéma général :



Comme les réactions de condensation de ces azides avec les acides aminés et les protéines, que nous décrirons dans les deux chapitres suivants, sont effectuées en milieu alcalin, il importe de connaître l'incidence propre de l'hydrolyse des trois isomères et d'établir les caractéristiques cinétiques de cette décomposition.

Nous exposerons, après quelques considérations sur le choix d'une méthode expérimentale, les résultats que nous avons acquis.

Nous essayerons enfin d'expliquer le mécanisme de la réaction d'hydrolyse ainsi que l'influence de l'isomérie sur cette décomposition.

A. — CHOIX DE LA MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

L'évolution du milieu réactionnel en cours d'hydrolyse a été suivie par spectrophométrie dans l'U. V. et constitue une application de nos résultats précédents. Nous savons en effet que les trois azides présentent des maximums d'absorption intense dans la bande des 200-300 mμ alors qu'après hydrolyse les acides correspondants ainsi que les ions N_3^- n'accusent, pour ces mêmes longueurs d'onde, qu'une absorption comparativement faible (fig. 4).

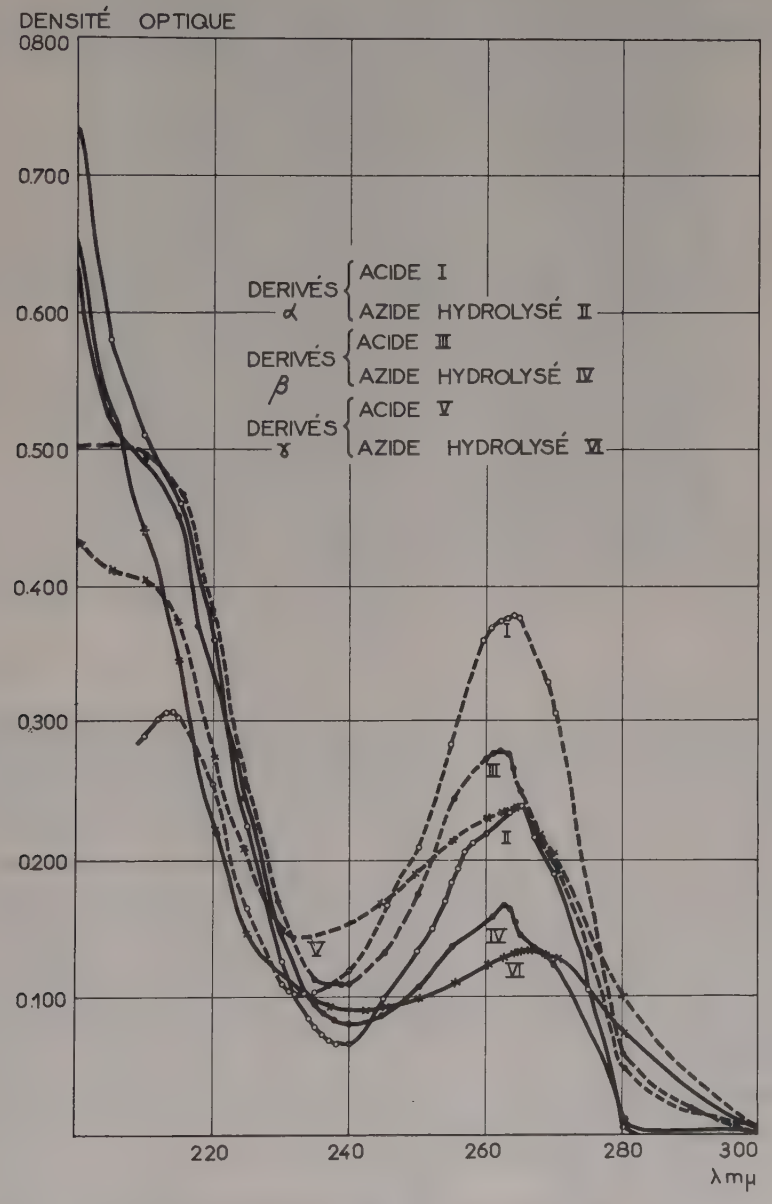


FIGURE 4

Spectres d'absorption des acides pyridine-carboxyliques et des produits d'hydrolyse de leurs azides.

On notera, dans les produits d'hydrolyse, la forte absorption dans les faibles longueurs d'onde due au groupement $—N_3$.

Nous avons groupé dans le tableau I les maximums des bandes d'absorption des azides avant et après hydrolyse. Signalons au passage la disparition normale du pic à 215 mμ de l'acide picolique du fait de la présence dans le milieu réactionnel des ions N_3^- qui se traduit par une augmentation importante de l'absorption dans le domaine des faibles longueurs d'onde comme nous l'avons montré précédemment.

Nous avons vérifié que l'absorption obéit à la loi de Beer-Lambert dans le domaine des concentrations utilisées. Dans ces conditions, nous pouvons admettre que le degré d'hydrolyse au cours du temps est une fonction linéaire de l'absorption mesurée. Les courbes d'absorption en fonction du temps doivent donc permettre de déterminer les caractéristiques cinétiques de ces hydrolyses.

Les longueurs d'onde utilisées correspondent au maximum d'absorption le plus intense pour les trois azides étudiés, soit :

234 mμ pour l'acide picolique;
235 mμ pour l'acide nicotique;
220 mμ pour l'acide *iso*nicotique.

TABLEAU I

LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMUMS DES AZIDES AVANT ET APRÈS HYDROLYSE

AZIDES	AVANT HYDROLYSE	APRÈS HYDROLYSE
Picolique	2 maximums $\lambda = 234$ mμ $\lambda = 269$ mμ	1 maximum $\lambda = 265$ mμ
Nicotique	1 maximum $\lambda = 235$ mμ	1 maximum $\lambda = 262$ mμ
*Iso*nicotique	2 maximums $\lambda = 220$ mμ $\lambda = 245$ mμ	1 maximum $\lambda = 266$ mμ

Les expériences ont été réalisées à des températures de 22 - 30 - 37 °C, sur des solutions de titre en azide compris entre 4 et 8×10^{-5} moles/l. En outre les réactions sont effectuées en milieu soigneusement tamponné, de *p*H compris entre 8,00 et 9,00, l'expérience ayant en effet montré que la vitesse d'hydrolyse est très sensible à l'action des ions OH^-.

La spectrophotométrie se montre une technique particulièrement avantageuse dans ces recherches car elle permet :

— des mesures précises, indispensables dans le mode d'interprétation adopté;
— l'utilisation de solutions très diluées d'azide, d'où la détermination séparée de l'ordre par rapport à l'azide seul (méthode d'isolement d'Ostwald);
— la diminution des risques d'altération des azides, composés très instables, puisque cette méthode est très rapide et s'effectue à température ambiante.

L'identification des produits d'hydrolyse est nécessaire pour établir une corrélation entre les données spectrales et les paramètres cinétiques vrais et pour savoir — ce qui est primordial pour l'interprétation cinétique — si la réaction est ou non équilibrée. Nous avons utilisé dans ce but la chromatographie sur papier. Nous avons pu montrer que les azides s'hydrolysent totalement en donnant les acides correspondants et que les durées correspondant à l'hydrolyse quasi totale sont sensiblement les mêmes, que l'on considère les variations du spectre d'absorption ou la disparition de l'azide par voie chromatographique.

Cette étude chromatographique est basée sur la mise en évidence du noyau pyridique par la réaction colorée classique de Konig au bromure de cyanogène [110]. Rappelons que la réaction est spécifique de la pyridine et de tous les dérivés pyridiques [68] à la condition que :

— l'azote pyridique soit trivalent afin que le dérivé pyridinium puisse se former par fixation du bromure de cyanogène;
— Le carbone α du noyau hétérocyclique ne soit pas substitué afin de permettre l'ouverture secondaire du cycle pyridique lors de l'alcalinisation qui constitue

la deuxième phase de la réaction (par la benzidine* par exemple) et la formation d'un dérivé coloré.

La réaction de König n'est donc positive qu'avec les dérivés β et γ. Cette réaction a été adaptée à la chromatographie sur papier par Kodicek et Reddi [109] et Huebner [99] (pour les précisions techniques voir détails expérimentaux).

La figure 5 illustre l'hydrolyse d'une solution d'azide *iso*nicotique à *p*H = 9,00. La concentration de la solution dont on a déposé 10 µl au spot de départ est de $2{,}7 \times 10^{-2}$ M.

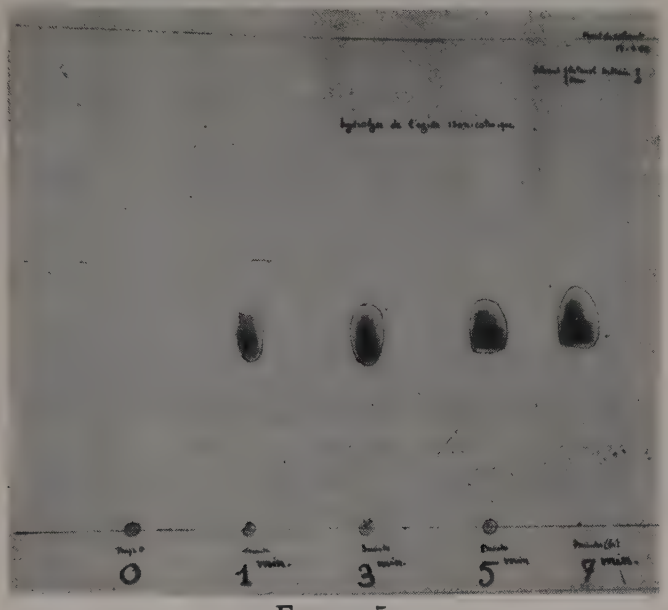
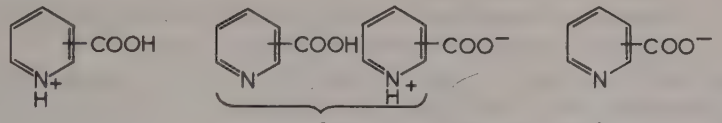


FIGURE 5

Hydrolyse de l'azide *iso*nicotique en milieu alcalin.
Influence du temps d'hydrolyse.
Phase solvante : butanol tertiaire/eau (8 : 2)
R_f de l'azide *iso*nicotique = 0,0
R_f du produit d'hydrolyse de l'azide = 0,42

Le produit d'hydrolyse de l'azide n'est pas l'acide pyridine-carboxylique lui-même, mais bien son sel de sodium puisque l'hydrolyse est réalisée en milieu alcalin.

Rappelons à ce sujet que les acides pyridine-monocarboxyliques peuvent exister sous trois formes ioniques différentes :



1 2 3

La forme 1 prédomine en milieu acide, la forme 3 en milieu alcalin; dans la région voisine du *p*H isoélectrique, les deux structures 2 sont les plus vraisemblables.

Nous avons rappelé ci-dessous les *p*K des acides pyridine-carboxyliques :

	pK_1	pK_2	Réf.
Acide picolique	1,55	5,32	[166]
	1,04	5,29	[84]
Acide nicotique	2,07	4,81	[84]
Acide *iso*nicotique	1,84	4,86	[84]

(*) Solution à 0,25 g p. 100 dans l'éthanol aqueux à 50 p. 100.

Nous avons groupé sur la figure 6 quelques renseignements concernant le comportement chromatographique des dérivés β et γ.

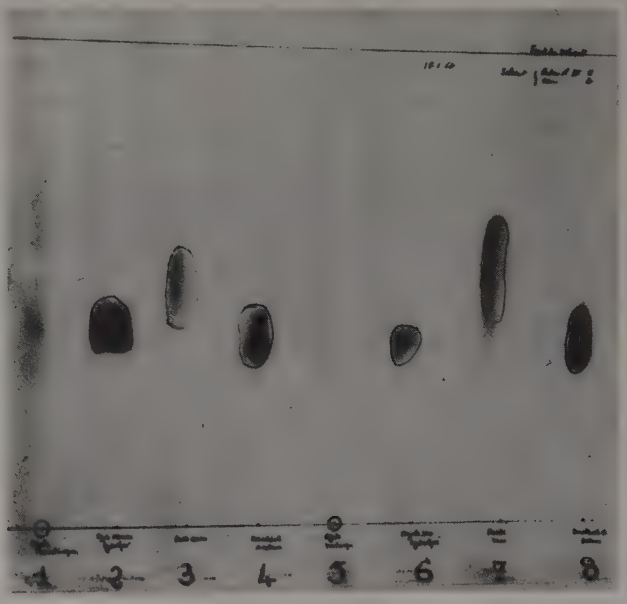


FIGURE 6

Etude chromatographique de divers composés pyridiques

1 azide *iso*nicotique ;
2 » » (hydrolysé) ;
3 acide *iso*nicotique ;
4 » » (sel Na) ;
5 azide nicotique ;
6 » » (hydrolysé) ;
7 acide nicotique ;
8 » » (sel Na) ;

On remarquera que les deux azides isomères ne migrent pas avec la phase solvante utilisée. On notera également la nette différence de R_f entre l'acide ($R_f = 0{,}51$) et son sel de sodium ($R_f = 0{,}42$), et l'absence de différence de R_f entre la série β et la série γ.

La réaction de König donne lieu aux colorations ci-dessous :

— azide nicotique, azide *iso*nicotique } rose
— acide nicotique et son sel : orangé, devenant rose;
— acide *iso*nicotique et son sel : bleu-violacé.

Nous avons mis en évidence l'acide azothydrique dans le liquide d'hydrolyse par la réaction au perchlorure de fer [50, 56]; l'acide azothydrique, acide de la force de l'acide acétique puisque sa constante d'équilibre est de $K = 2{,}80 \times 10^{-5}$ [147] se trouve aussi, dans le milieu d'hydrolyse, sous la forme ionisée. Son *p*K est de 4,55.

B. — RÉSULTATS

Nous indiquerons tout d'abord ceux relatifs à l'ordre de la réaction d'hydrolyse, puis ceux concernant la stabilité des azides.

1° *Ordre de la réaction*

La mise en évidence de l'ordre de la réaction s'est avérée particulièrement délicate en raison :

a) de l'imprécision notable sur l'instant zéro de l'hydrolyse qui provient :
— du temps mort des manipulations initiales (mélange des solutions, remplissage des cuves, ...) difficile à apprécier;
— de l'incertitude sur les titres initiaux en azide (solutions très diluées et instabilité de ces corps).

Une extrapolation graphique du nombre $D = f(t)$ (D étant la densité optique) à $t = 0$ ne peut donc fournir qu'une valeur très approchée de D_t.

b) de l'intervention en début des réactions, d'une dégradation de Curtius transformant l'azide en isocyanate (*). En effet l'expérience montre que, lors du mélange des solutions, il se produit un dégagement gazeux vraisemblablement d'azote. Nous avons en effet vérifié qu'il ne s'agissait pas d'N_3H qui aurait rougi un papier imprégné de $FeCl_3$; il ne peut s'agir non plus de gaz carbonique, provenant d'une éventuelle décarboxylation de l'acide.

La dégradation de Curtius qui se produit en milieu acide [136, 41, 140, 180], s'avère, dans les milieux basiques utilisés ici, très limitée, du moins à 22 et 30 °C et n'altère pratiquement pas le cours de la réaction d'hydrolyse pendant la période effective des mesures. Par contre à 37° elle est beaucoup plus importante et apporte une perturbation initiale notable de l'ordre de la réaction.

Pour les raisons précédentes il n'est pas possible, pour déterminer l'ordre, d'utiliser les formules intégrales (par exemple du type $ln \frac{a}{a-x} = kt$, a étant la concentration initiale, $a - x$ étant la concentration au temps t), puisque l'absorption initiale est mal connue, pas plus que les formules différentielles courantes. Nous avons utilisé une méthode par différences premières très récente, $\Delta x = f(x)$, que nous a conseillée Broche [19, 20] ; Δx représente la différence des lectures de densité optique à des instants t et $t + \tau$, τ étant un intervalle de temps constant laissé au choix de l'opérateur; pratiquement τ doit avoir une valeur inférieure ou égale au temps de demi-réaction $\mathcal{O}$.

Le détail de nos investigations sera exposé par ailleurs [26]. Nous résumerons ici nos résultats, en donnant simplement un exemple de courbe obtenue à 22 °C (fig. 7 et 8) et un autre exemple à 37 °C (fig. 9 et 10) température où l'hydrolyse se trouve partiellement perturbée au début de la réaction par la transposition de Curtius.

Le graphique de la figure 8 correspond à une droite : tous les points obtenus sont très sensiblement alignés. La dispersion est très faible malgré la dilatation d'ordonnée considérable que l'on a adoptée (800).

Il en résulte que la réaction est d'ordre un dans tout l'intervalle de mesure c'est-à-dire de $t = 1$ min à l'∞.

Le graphique de la figure 10 s'avère plus complexe. Dans la partie AB, la représentation $\Delta x = f(x)$ se traduit par une portion sensiblement incurvée. La réaction, sur la base des mesures spectrophotométriques, n'est pas du premier ordre. La durée correspondante s'étend de 1 minute à 6 minutes, soit la période $\mathcal{O}$.

Au contraire, dans la portion BC (correspondant à des temps compris entre la période et la fin de la réaction), les points sont très sensiblement alignés, malgré l'amplification considérable (1000) des ordonnées. On peut en conclure que, dans ce stade final, la réaction est d'ordre un.

Il n'y a aucune raison de supposer qu'à 37 °C il se produit, à l'origine, une modification du mécanisme réactionnel, mais simplement une perturbation des mesures spectrophotométriques initiales en raison de la dégradation de Curtius que nous avons signalée plus haut.

Pour les différentes températures étudiées et pour les différents azides isomères, nous avons obtenu les mêmes résultats : les réactions d'hydrolyse en fonction du temps sont du premier ordre par rapport à l'azide.

(*) La présence de petites quantités d'isocyanate provenant d'une réaction de Curtius parasite ne modifie pratiquement pas les faibles absorptions pour les longueurs d'onde précitées.

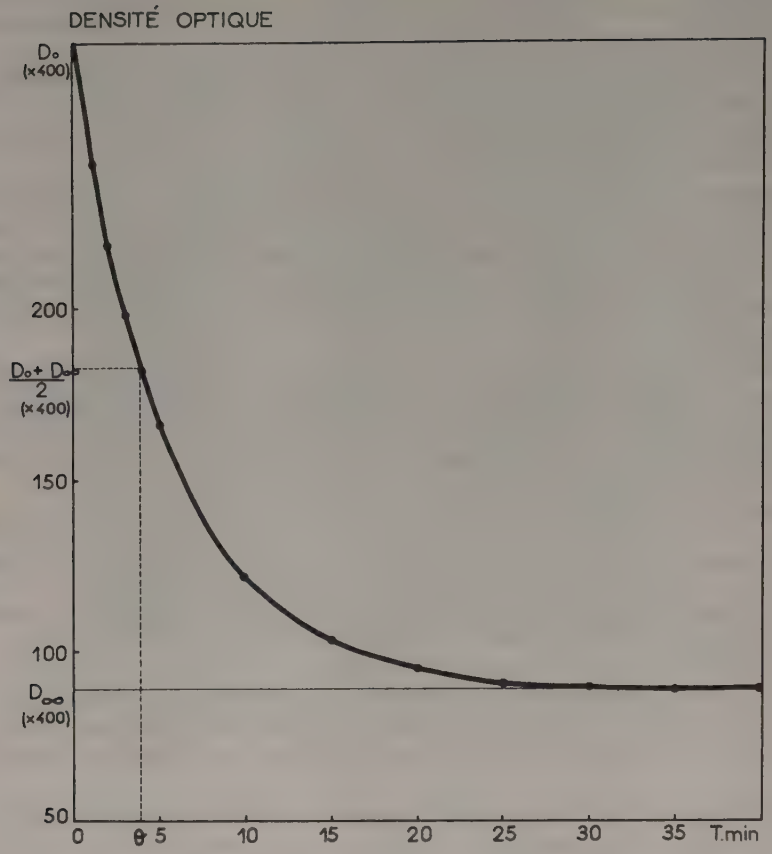


FIGURE 7

Réaction d'hydrolyse de l'azide *isonicotique* (pH = 8,96; t = 22 °C)
Variations de la densité optique à λ = 220 mμ en fonction du temps.

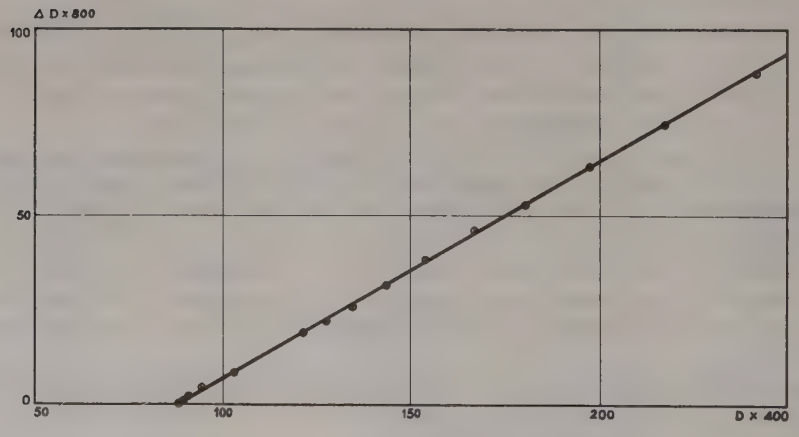


FIGURE 8

Réaction d'hydrolyse de l'azide *isonicotique* (pH = 8,96; t = 22 °C)
Détermination de l'ordre de la réaction.

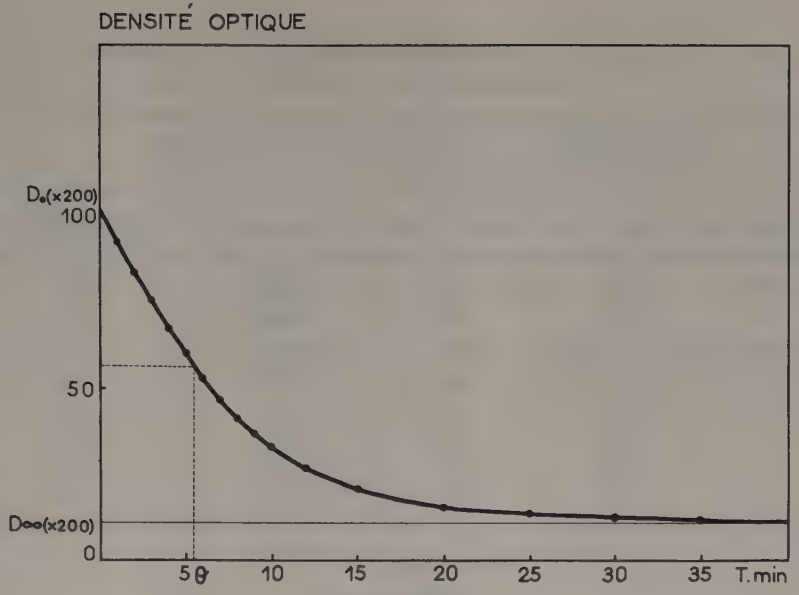


FIGURE 9

Réaction d'hydrolyse de l'azide nicotique (pH = 8,84; t = 37 °C)
Variations de la densité optique à λ 235 mμ en fonction du temps.

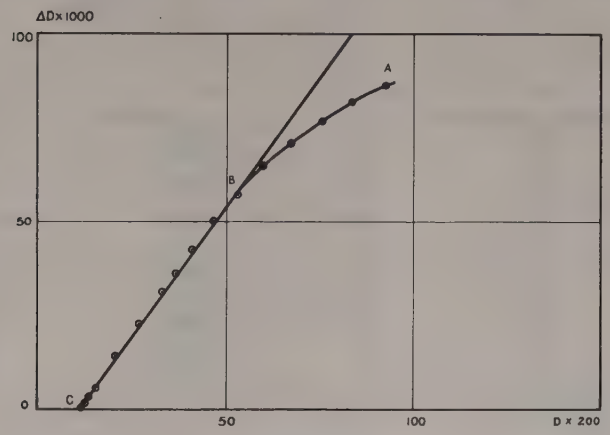


FIGURE 10

Réaction d'hydrolyse de l'azide nicotique (pH = 8,84; t = 37 °C)
Détermination de l'ordre de la réaction.

2° ***Les constantes d'hydrolyse; la stabilité des azides.***

Les constantes d'hydrolyse ont été déterminées à partir des données précédentes. A étant la pente de la droite $\Delta x = f(x)$, nous aurons :

$$k = -\frac{1}{\tau} \ln (1 - A) = -\frac{2{,}30}{\tau} \log_{10} (1 - A)$$

k étant exprimé en min^{-1}. Des valeurs de k, on peut retirer la valeur du temps de demi-réaction :

$$\theta = \frac{\ln 2}{k} = \frac{2{,}30 \log_{10} 2}{k} = \frac{0{,}692}{k}$$

Nos résultats sont donnés dans les tableaux ci-après.

TABLEAU II

AZIDE PICOLIQUE ($\lambda = 234\ m\mu$)
CONSTANTES DE VITESSE D'HYDROLYSE k ET TEMPS DE DEMI-RÉACTION θ
EN FONCTION DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE

t °C	pH	k MIN$^{-1} \times 10^2$	$\log_{10} k$	θ MIN. et 1/10 ou 1/100 MIN.
22	8,05	1,18	$\bar{2}$,07128	58,70
	8,46	2,85	$\bar{2}$,15484	24,30
	8,95	8,90	$\bar{2}$,94939	7,78
30	8,02	2,58	$\bar{2}$,41162	26,80
	8,98	22,3	$\bar{1}$,34830	3,10
37	8,00	4,46	$\bar{2}$,64933	15,50
	8,30	8,71	$\bar{2}$,94002	7,95
	8,54	15,1	$\bar{1}$,17898	4,58
	8,84	29,6	$\bar{1}$,47129	2,34
	9,00	42,4	$\bar{1}$,62737	1,63

TABLEAU III

AZIDE NICOTIQUE ($\lambda = 235\ m\mu$)
CONSTANTES DE VITESSE D'HYDROLYSE k ET TEMPS DE DEMI-RÉACTION θ
EN FONCTION DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE

t °C	pH	k MIN$^{-1} \times 10^2$	$\log_{10} k$	θ MIN. et 1/10 ou 1/100 MIN.
22	8,04	0,360	$\bar{3}$,55630	192
	8,46	0,891	$\bar{3}$,94988	77,70
	9,00	3,27	$\bar{2}$,51455	21,20
30	8,02	0,977	$\bar{3}$,98989	70,90
	8,98	8,11	$\bar{2}$,90902	8,54
37	8,00	2,38	$\bar{2}$,37658	29,10
	8,30	4,58	$\bar{2}$,66087	15,10
	8,54	7,75	$\bar{2}$,88930	8,94
	8,84	16,3	$\bar{1}$,21219	4,25
	8,98	21,9	$\bar{1}$,34044	3,16

TABLEAU IV

AZIDE *iso*NICOTIQUE ($\lambda = 220\ m\mu$)
CONSTANTES DE VITESSE D'HYDROLYSE k ET TEMPS DE DEMI-RÉACTION θ
EN FONCTION DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE

t °C	pH	k MIN$^{-1} \times 10^2$	$\log_{10} k$	θ MIN. et 1/10 ou 1/100 MIN.
22	8,02	2,08	$\bar{2}$,31806	33,30
	8,50	6,22	$\bar{2}$,79379	11,10
	8,96	17,1	$\bar{1}$,23300	4,05
30	8,03	4,58	$\bar{2}$,66087	15,10
	9,05	45,0	$\bar{1}$,65321	1,54
37	8,01	8,23	$\bar{2}$,91540	8,42
	8,54	27,0	$\bar{1}$,43136	2,56
	8,84	56,3	$\bar{1}$,75051	1,25
	9,04	83,0	$\bar{1}$,91908	0,835

L'ordre un précédemment mis en évidence permet d'écrire que la vitesse d'hydrolyse des azides v est égale à :

$$v = k \text{ [azide]} \quad \text{(au cours du temps)}$$

Mais l'expérience a montré que la constante de vitesse k de cette réaction du premier ordre (par rapport à l'azide) est fonction du pH du milieu.

L'augmentation de la constante de vitesse en fonction du pH suggère une catalyse par les ions OH^-. Pour mettre cet effet en évidence, on a reporté sur les graphiques de la figure 11, pour chacun des azides, la valeur de $\log_{10} k$ en fonction du pH (échelle 10^2 en ordonnées et abcisses).

On constate sur ces graphiques que, pour chaque température, les points $\log_{10} k = f(p\text{H})$ se placent convenablement sur une droite de pente un.

On doit en conclure que :

$$k = k_1 \text{ [OH}^-\text{]}$$

k_1 étant la constante de catalyse basique.

En effet, on peut écrire, puisque

$$[H^+]\,[OH^-] = k_e \simeq 10^{-14}$$

$$k = k_1 \frac{k_e}{[H^+]}$$

d'où

$$\log_{10} k = \log_{10} (k_1 k_e) - \log_{10} [H^+]$$

$$\log_{10} k = \log_{10} (k_1 k_e) + p\text{H}$$

qui représente bien, en fonction du pH, une droite de pente un et d'ordonnée à l'origine $\log (k_1 k_e)$.

Les valeurs de k_1 obtenues par cette méthode sont indiquées dans le tableau V pour les différentes azides, à 22, 30 et 37 °C.

TABLEAU V

VALEURS DES CONSTANTES DE CATALYSE BASIQUE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE À $p\text{H} = 8{,}00$

$10^{-4} k_1$ (l. mole^{-1}.min^{-1})

t °C	AZIDE PICOLIQUE	AZIDE NICOTIQUE	AZIDE *iso*NICOTIQUE
22	1,02	0,331	1,97
30	2,40	0,901	4,17
37	4,45	2,16	7,945

Des résultats qui précèdent, on peut tirer les conclusions suivantes :

1) Les réactions d'hydrolyse des 3 azides sont, à toutes températures, du premier ordre par rapport à l'azide et du premier ordre par rapport aux ions OH^-.

L'ordre global est donc deux, et l'on peut écrire que la vitesse d'hydrolyse de ces azides est de la forme :

$$v = k_1 \text{ [OH}^-\text{] [azide]}$$

2) Les constantes de vitesse k (et aussi k_1) sont considérablement plus faibles pour l'azide nicotique (dérivé β) que pour les azides picolique et *iso*nicotique (dérivés α et γ).

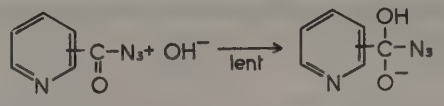
3) Les constantes de deuxième ordre k_1 (ou de catalyse basique) ont des valeurs très élevées. L'effet de catalyse basique est donc très important.

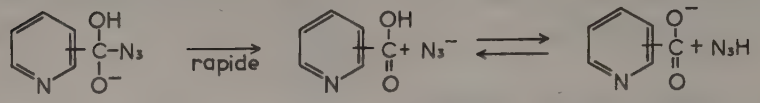
C. — MÉCANISME RÉACTIONNEL. INFLUENCE DE L'ISOMÉRIE

La loi de vitesse observée :

$$v = k_1 [OH^-] [azide]$$

suggère le mécanisme réactionnel suivant, pour l'hydrolyse des 3 azides isomères en milieu alcalin :

I 

II 

Le premier stade (I) comporte l'attaque nucléophile de l'ion OH^- sur le carbone électrophile du carbonyle. C'est le stade le plus lent qui impose la loi de vitesse observée.

Le deuxième stade (II) consiste en la rupture de la liaison azide dans le complexe formé dans le premier stade, suivi de l'équilibre ionique des acides correspondants.

Aucune incidence de ce deuxième stade ne se manifestant dans la loi cinétique, on doit admettre qu'il est très rapide.

Le fait que les molécules d'eau n'interviennent pas dans la loi cinétique est normal, puisque la réaction s'opérant en milieu très dilué l'eau constitue le corps de fond. Elle intervient en fait dans les équilibres ioniques généraux.

Ce mécanisme présente une analogie étroite avec celui de l'hydrolyse des amides en milieu basique, mais s'en différencie par l'intensité de l'action des ions OH^-. Ainsi pour les amides dérivées du noyau pyridique les constantes de vitesse du second ordre varient entre (4,05 et 19,44) 10^{-3} l.mole^{-1} min^{-1} [69]. Dans le cas des amides aromatiques on retrouve des valeurs du même ordre de grandeur [123].

En définitive, pour interpréter complètement les résultats cinétiques obtenus, il reste à déterminer dans quelle mesure le schéma réactionnel proposé permet d'expliquer :

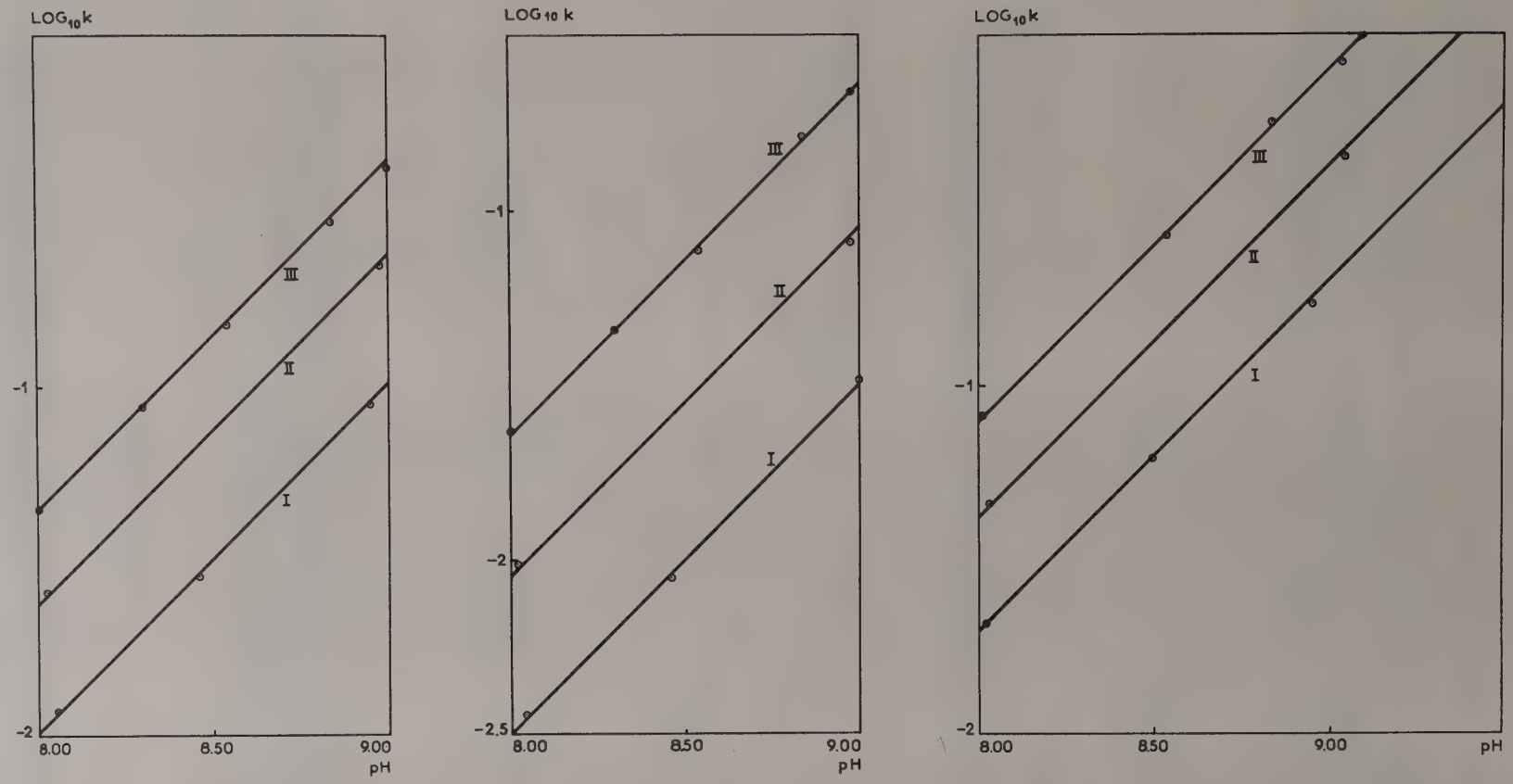
1) les différences observées de vitesse dans l'hydrolyse des trois isomères;

2) la réactivité dans l'ensemble très élevée de ces isomères vis-à-vis des ions OH^-.

Les calculs quanto-mécaniques n'ont pas permis, à la différence du cycle benzénique, de déterminer avec précision les densités électroniques des atomes du cycle pyridique. On sait cependant que, dans le cycle isolé, par effet —M, la densité électronique sur l'azote est plus élevée, et qu'il présente, au point de vue mésomérique, 3 formes de Kekulé, 3 de Dewar et 3 chargées [8]. L'introduction sur un carbone du cycle d'un groupe peut permettre, selon la position du substituant, de réaliser une conjugaison entre la double liaison de C = O et celle de l'azote, soit en α soit en γ.

L'azote, par son doublet libéré, peut alors fonctionner comme donneur d'électrons et les zones de forte densité électronique se localisent sur les carbones en α et γ de l'azote (plus particulièrement en α). De là il résulte, outre l'effet —I de l'oxygène de C = O, que le carbone du carbonyle, dans les positions α et γ, possède un caractère nettement électrophile. De ce fait la fixation de l'ion OH^- sera plus facile, donc plus rapide dans ces positions qu'en β, comme le confirme l'expérience.

En réalité, en position α, le carbone de C = O devrait être plus électrophile qu'en γ, et par suite la réaction d'hydrolyse plus rapide ; c'est l'inverse qui est observé. Cette contradiction s'observe en fait aussi, mais dans le cas de substitutions électrophiles, dans le noyau benzénique, et on peut le résoudre sur la base d'un effet d'encombrement stérique, qui dans le cas présent, ne peut être invoqué.



azide picolique

azide nicotique

azide *iso*nicotique

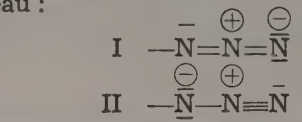
FIGURE 11

Hydrolyse des azides pyridine-carboxyliques
(influence du *p*H)

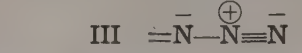
I = à 22 °C
II = à 30 °C
III = à 37 °C

Ces considérations, valables en général pour le groupe —C(=O)—R, n'expliquent pas pourquoi, en général, la vitesse d'hydrolyse est nettement plus élevée pour les azides ($R = -N_3$) que pour les amides ($R = -NH_2$).

Il faut admettre alors que le groupement azide exalte le pouvoir électrophile du carbone de C = O. L'étude par spectrographie en rayons X du groupement N_3 (dans l'ion, l'acide ou les esters) est linéaire, et PAULING a proposé diverses formes mésomères, que nous rappelons à nouveau :

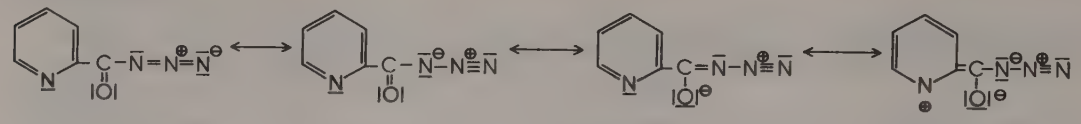


On peut en outre envisager la représentation formelle suivante qui n'intervient que dans l'association groupement azide - noyau pyridoyle :



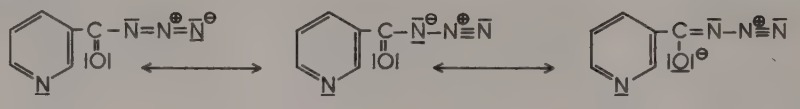
L'étude spectrale dans l'U.V., que nous avons faite pour les 3 azides isomères, les acides correspondants et divers composés plus simples dont on peut les faire schématiquement dériver permettent de penser que les formes mésomères qui apportent la plus forte contribution, sont dans les 3 azides, compte tenu de la mésomérie propre du noyau :

Dérivé picolique :



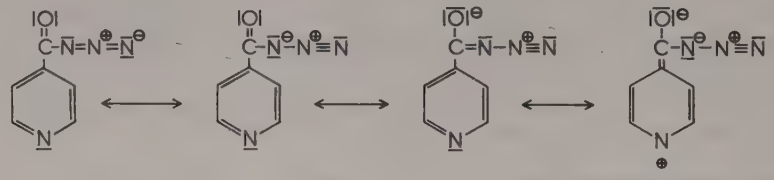
I II III IV

Dérivé nicotique :



I II III

Dérivé isonicotique :



I II III IV

Dans ces diverses formes, soit par la conjugaison propre qu'il apporte, soit par sa polarité, le groupe azide renforce en général l'activité électrophile du C de C = O, en laissant subsister les écarts relatifs dus aux positions α, β, γ, ce qui explique la réactivité particulière de ces azides vis-à-vis des ions OH^-.

Partie expérimentale

L'étude spectrophotométrique a été réalisée au moyen du spectrophotomètre Unicam SP 500 avec des cuves de quartz de 1 cm d'épaisseur à des températures variables. Pour l'étude de la variation de la vitesse

d'hydrolyse en fonction du pH, nous avons utilisé des solutions de borate de sodium/HCl entre pH 8,00 et et 9,00 et des solutions de phosphates d'après Sörensen de pH 7,00 à 8,00 ces sels n'influençant pas les mesures dans l'ultra-violet aux longueurs d'onde considérées. Les solutions à étudier sont préparées en fioles jaugées de 250 ml dans la proportion de 8 μg au ml, l'azide étant au préalable dissous dans 0,1 ml de dioxanne.

L'étude chromatographique a été faite en technique ascendante sur papier Whatman n° 1 à la température du laboratoire, à partir d'une solution à la concentration de $2{,}7 \times 10^{-2}$ M. Le solvant chromatographique est un mélange de butanol tertiaire et d'eau, dans la proportion de 8 parties d'alcool pour 2 parties d'eau distillée. Après 30 heures le front du solvant est à 23,5 cm environ du point de départ. Le papier est séché à l'air, pulvérisé d'une solution de benzidine à 0,25 g p. 100 dans l'éthanol aqueux à 50 p. 100 et exposé, pendant quelques minutes, aux vapeurs de bromure de cyanogène.

La mise en évidence de la perturbation initiale que nous attribuons à une réaction limitée de Curtius a pu être faite grâce à l'appareil de Warburg (*) dans des fioles à commande magnétique, avec récipient intérieur et tubulure excentrique. Dans la tubulure on dispose un papier filtre imprégné d'une solution de perchlorure de fer à 10 p. 100, 4,5 ml de tampon de pH désiré sont placés dans la fiole, 100 mg d'azide dissous dans 0,5 ml de dioxanne étant mis dans le récipient intérieur maintenu par un aimant.

Les fioles sont reliées à un manomètre et portées au B.M. à 37° pendant quelques instants. Le temps 0 de la réaction est indiqué par la mise en contact de la solution d'azide avec la solution tampon, lorsqu'on retire l'aimant : un dégagement gazeux se produit, enregistré par le manomètre.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Au début de ce chapitre, nous avons exposé la synthèse des azides des acides pyridine-monocarboxyliques. Nous avons utilisé la méthode originale de Curtius qui réalise la préparation de ces dérivés par les stades de l'ester et de l'hydrazide.

Nous avons ensuite étudié les spectres en U.V. des azides pyridiques. Une comparaison de ces spectres à ceux des acides correspondants et aux spectres de composés plus simples, l'azoture de sodium et le benzazide, nous a montré que l'introduction d'un groupement —N_3 dans une molécule d'acide se traduit par une augmentation générale et très importante de l'absorption : l'hyperchromicité dans le domaine des faibles longueurs d'onde apparaît caractéristique au groupement —N_3 lui-même tandis que l'hyperchromicité vers les plus fortes longueurs d'onde et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption (pour le dérivé γ) seraient en rapport avec la possibilité pour le groupement —N_3 et le noyau hétérocyclique auquel il est lié, d'exister sous plusieurs structures de résonance.

Nous continuons par une étude cinétique de la réaction d'hydrolyse des azides pyridiques qui se transforment en acides en milieu alcalin. Nous avons vérifié par chromatographie que cette réaction était totale. L'étude de la cinétique a été réalisée par spectrophotométrie en U.V. en suivant l'effacement de l'un des maximums de l'azide au cours du temps. Nous avons établi les constantes de vitesse d'hydrolyse (k) et les constantes de catalyse basique (k_1) pour les trois azides isomères et montré que les réactions d'hydrolyse des trois azides isomères sont du premier ordre par rapport à l'azide et du premier ordre par rapport aux ions OH^-, ceci à toutes les températures examinées.

L'ordre global est donc deux et l'on peut écrire que la vitesse d'hydrolyse de ces azides est de la forme :

$$v = k_1 [OH^-] [\text{azide}]$$

Nous avons proposé enfin un mécanisme réactionnel que suggère cette loi de vitesse observée. Les constantes de vitesse k et de catalyse k_1 sont beaucoup plus faibles pour l'azide nicotique que pour les azides picolique et *iso*nicotique. En outre les constantes k_1 ont des valeurs très élevées ce qui indique un effet de catalyse basique très important. L'exaltation du pouvoir électrophile de l'atome de carbone du groupement carbonyle et les formes mésomères possibles du groupement —N_3 et du noyau hétérocyclique expliqueraient ces phénomènes.

(*) Etablissements Braun Melsungen, Allemagne.

CHAPITRE II

ACTION DES AZIDES PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUES SUR QUELQUES AMINO-ACIDES

Nous avons signalé dans notre introduction que nos premières recherches expérimentales ont porté sur l'action des azides de la série pyridique sur différentes protéines, et plus particulièrement sur la sérum-albumine de bœuf. Cette macromolécule possède, comme toutes les protéines, de nombreuses fonctions chimiques réactives parmi lesquelles les groupements amine primaire semblent les groupements à hydrogène mobile les plus susceptibles de réagir avec les azides. Aussi avons-nous consacré le deuxième chapitre de notre travail à l'action des azides sur quelques composés aminés de structure plus simple constitués par différents amino-acides. Nous discuterons dans le chapitre III l'action des azides sur les composés phénoliques, autres dérivés à hydrogène mobile capables d'entrer en réaction avec eux. Quant aux groupements thiols, dont on peut également soupçonner la réactivité, nous les avons provisoirement éliminés en raison de la très faible proportion de groupements — SH libres dans la sérum-albumine native.

Nous examinerons successivement :

— la réaction des azides pyridine-carboxyliques sur la fonction amine;
— la description de quelques N-*iso*nicotylaminoacides ;
— quelques propriétés biologiques des dérivés précédents.

I. — ACTION DES AZIDES PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUES SUR LA FONCTION AMINE

D'une manière générale, les acidylazides réagissent sur la fonction amine en donnant soit des amides, soit des urées dissymétriques. Nous avons emprunté au manuel classique de Grignard [23] les schémas réactionnels suivants :

$$\text{(A)}\quad R-CON_3 + {}_2R'-NH_2 \rightarrow R-CONH-R' + R'-NH_2,\ N_3H$$

$$\text{(B)}\quad R-CON_3 + R'-NH_2 \rightarrow \begin{matrix} R-NH \\ R'-NH \end{matrix}\!\!>\!C=O + N_2$$

La première de ces réactions peut s'effectuer à chaud ou à froid alors que la seconde se fait toujours à forte température, par l'intermédiaire de l'isocyanate :

$$R-CON_3 \rightarrow N_2 + R-N=C=O$$

$$R-N=C=O + R'-NH_2 \rightarrow R-NH-CO-NH-R'$$

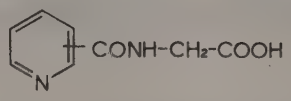
Nous devons à Curtius [46] la découverte de la réaction A. La première condensation amine-azide a été obtenue par chauffage d'une solution éthérée d'aniline avec le benzazide. L'application de cette première réaction, due à Curtius lui-même [51], consiste en l'édification progressive d'enchaînements d'acides aminés et formation de polypeptides nouveaux. Cette condensation se fait dans des conditions très précises, à froid en milieu basique.

La seconde réaction a été exploitée par Sah et ses élèves [151] pour l'identification de composés organiques.

Le but de ce travail étant d'étudier la fixation du groupement pyridique sur les protéines, substances particulièrement fragiles, nous n'envisagerons que l'action de l'azide sur la fonction amine à froid et en milieu alcalin. Nous avons donc été amenée à prendre un acide aminé comme produit d'étude.

Notre choix a porté sur le glycocolle, acide aminé le plus simple dont les dérivés pyridiques, acide nicotinurique [2, 124, 72, 149], *iso*nicotinurique [124, 75] et picolinurique [124, 22] sont bien connus, et même, pour certains, disponibles sur le marché chimique.

Leur formule est la suivante :



Nous ne développerons pas ici l'historique de ces composés, ni leur préparation qui seront repris dans les pages suivantes. Nous exposerons les résultats obtenus par l'étude chromatographique de la réaction azides pyridine-carboxyliques-glycocolle. Nous avons sélectionné cette méthode car sa sensibilité est particulièrement appropriée à l'étude de l'évolution chimique du milieu réactionnel au cours du temps.

Nous avons vu en effet, dans le précédent chapitre, que le noyau pyridique peut être mis en évidence grâce à une réaction colorée applicable en chromatographie sur papier, pour autant que le carbone α de l'hétérocycle ne soit pas substitué.

Les produits de condensation acide aminé-azide, tout au moins les dérivés β et γ [52, 181], peuvent donc être identifiés par cette technique au même titre que leurs acides correspondants.

Nous avons groupé dans le tableau ci-dessous quelques caractéristiques chromatographiques des acides nicotinurique et *iso*nicotinurique, ainsi que celles des acides dont ils dérivent.

TABLEAU VI

CARACTÉRISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES DE DIVERS COMPOSÉS PYRIDIQUES

SUBSTANCES	R_f (*)	COLORATION (BrCN + BENZIDINE)
acide *iso*nicotique	0,33	bleu-violacé
acide *iso*nicotinurique	0,26	bleu-violacé
acide nicotique	0,29	orange devenant rose
acide nicotinurique	0,19	rose

La ninhydrine, en solution à 0,2 p. 100 dans du n-butanol saturé d'eau, révélateur classique des groupements aminés [131], ne donne aucune réaction avec ces dérivés pyridiques. Il en est de même lorsque la réaction est effectuée en milieu liquide [133]. En effet, la ninhydrine va nous permettre par ailleurs de contrôler la disparition du glycocolle du milieu réactionnel.

A. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA RÉACTION DES AZIDES PYRIDIQUES AVEC LE GLYCOCOLLE

Nous allons étudier successivement le comportement des trois azides isomères vis-à-vis :

— soit d'une quantité stoechiométrique de glycocolle, condition expérimentale de la préparation générale des dérivés N-pyridoylaminoacides;

— soit d'une quantité nettement inférieure de glycocolle, condition expérimentale de la fixation du groupement pyridique sur une protéine.

(*) Chromatographie ascendante; phase solvante : butanol tertiaire-eau (8 : 2, v/v); spots réalisés à partir d'une solution en tampon borate $pH = 9{,}00$.

Après mise en contact à la température ambiante de l'acide aminé et de l'azide en solution à concentration désirée dans un tampon de pH donné, des prélèvements sont faits à des intervalles de temps déterminés (cf. partie expérimentale) et étudiés chromatographiquement.

La première série d'essais a porté sur des produits en solution dans un tampon pH = 9,00. Quel que soit l'isomère considéré (β ou γ), si l'on met en présence une quantité d'azide double de celle du glycocolle, bromure de cyanogène et benzidine révèlent la formation d'acide pyridine-monocarboxylique et d'acide N-pyridoylglycocolle (figure 12). L'hydrolyse de l'azide marche donc de pair avec la réaction de formation du dérivé pyridique du glycocolle

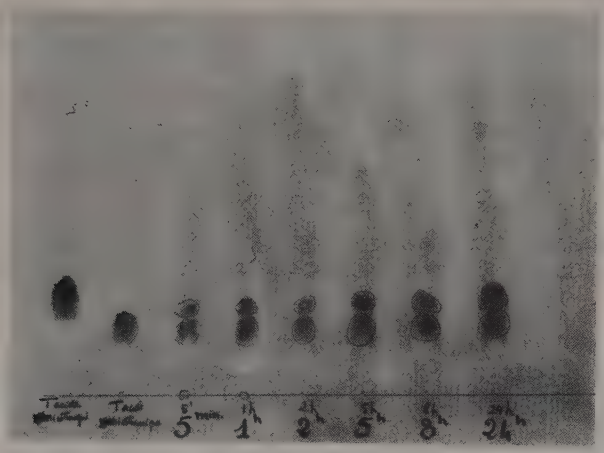


FIGURE 12
Action de l'azide *isonicotique* en excès sur le glycocolle

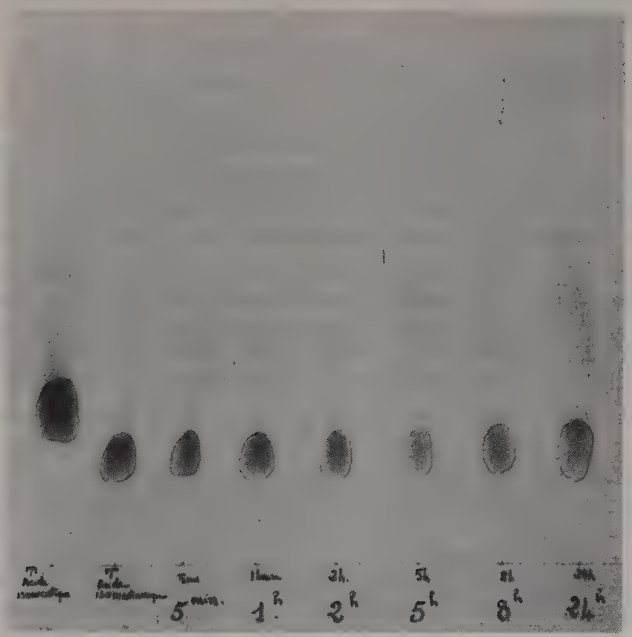


FIGURE 13
Action de l'azide *isonicotique* sur une quantité stoechiométrique de glycocolle.

Toutefois, si l'acide *iso*nicotique se forme en quantité suffisante pour être révélé dès le début de la réaction au même titre que l'acide *iso*nicotinurique, il n'en est pas de même pour l'isomère β : l'acide nicotique ne se décèle qu'après 1 heure de contact. Nous savons qu'à pH = 9,00 et à 22° C, la vitesse d'hydrolyse de l'isomère β est faible; elle est vraisemblablement inférieure à la vitesse de formation du produit de condensation.

Les dérivés β et γ se comportent d'une manière identique lorsqu'on fait agir glycocolle et azide en quantité stoechiométrique. Seul le dérivé pyridique de l'acide aminé est décelable à la révélation (figure 13). Nous pouvons en conclure que les vitesses de transformation des azides en N-pyridoylglycocolle sont plus élevées que les vitesses respectives d'hydrolyse des azides.

Une étude qualitative du glycocolle disparu donnera une idée plus précise des vitesses comparatives de transformation en N-pyridoylaminoacides des trois azides (tableau VII).

Il apparaît nettement que les vitesses de réaction vont en ordre décroissant de l'isomère α à l'isomère γ, puis à l'isomère β, et ceci pour les deux proportions relatives des réactifs mis en présence.

TABLEAU VII

RÉACTION DES AZIDES PYRIDIQUES SUR LE GLYCOCOLLE.
VARIATIONS DE L'ACIDE AMINE LIBRE EN FONCTION DU TEMPS.

Milieu tamponné pH = 9,00
A = azide en excès;
B = azide en quantité stoechiométrique.

Temps de contact, minutes		0,5	1	5	15	30	60	120	300
Azide picolique	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B			+	±	0	0	0	0
Azide isonicotique	A	++	+	0	0	0	0	0	0
	B			++	++	+	+	±	0
Azide nicotique	A	++++	++++	+++	++	+	+	±	0
	B			++++	++++	+++	+++	++	+

Une deuxième série d'expériences nous montre que l'augmentation du pH présente une influence favorable sur la réaction de condensation.

Nous avons, dans ce but, utilisé soit l'eau distillée comme solvant, soit des solutions tampons de pH divers, et noté le temps d'apparition du produit de condensation pour des mélanges stoechiométriques, ceci pour les seuls dérivés β et γ (tableau VIII).

Dans une troisième série d'essais nous avons tenté d'exprimer quantitativement la vitesse de formation des dérivés pyridiques en dosant, à l'aide d'un densitomètre, l'intensité des taches de bleu de Ruhemann formées après un temps déterminé. Nous nous sommes placée dans des conditions telles que l'incidence de la réaction d'hydrolyse soit négligeable, c'est-à-dire en faisant agir azide et acide aminé en quantité stoechiométrique.

TABLEAU VIII

RÉACTION DES AZIDES PYRIDIQUES AVEC LE GLYCOCOLLE.
FORMATION DU PRODUIT DE CONDENSATION EN FONCTION DU pH.

	AZIDE *iso*NICOTIQUE				AZIDE NICOTIQUE			
pH	6,90	8,00	8,50	9,00	6,90	8,00	8,50	9,00
5 minutes .	0	±	+	++	0	0	±	+
15 minutes .	0	+	++	+++	0	±	+	+++
3 heures ..	0	++	+++	+++	0	+	++	+++
24 heures ..	0	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++

De plus pour obtenir des dosages aussi précis que possible, il faut que :
— l'intensité des taches soit suffisamment grande pour pouvoir être enregistrée et ne pas se confondre avec les irrégularités enregistrées du papier : donc la réaction ne doit pas être trop rapide;
— la variation d'intensité soit assez prononcée, ce qui exclut les réactions trop lentes.

Dans nos conditions expérimentales de concentration et de *p*H, seuls ont pu être réalisés des dosages avec les isomères α et β à $p\mathrm{H} = 8{,}50$ (22° C). Le tableau qui suit (tableau IX) donne les résultats de ces deux expériences, illustrées par les courbes de la figure 14.

TABLEAU IX

DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE GLYCOCOLLE NON COMBINÉ EN FONCTION DU TEMPS

t minutes	POURCENTAGE DE GLYCOCOLLE NON COMBINÉ	
	AZIDE PICOLIQUE	AZIDE NICOTIQUE
5	61,20	74,70
15	39,90	60,10
30	29,40	47,80
60	22,70	33,20
90	19,20	30
120	19,20	21,50
180		19

La détermination de l'ordre a été faite par la méthode $\Delta x = f(x)$ (figure 15). Nous remarquons d'une part que le premier point des deux courbes $\Delta x = f(x)$ ne suit pas la linéarité et que d'autre part les points sont moins bien alignés dans la réaction de condensation azide picolique-glycocolle. Nous pensons que la cause d'erreur principale en est la suivante : la mise en place du spot au moyen de la micropipette exige quelques instants pendant lesquels la réaction se poursuit. L'erreur est de ce fait plus élevée lorsque la lecture est faite après un laps de temps court (cas de la première lecture). Elle se répète d'autant plus volontiers que la réaction est plus rapide (cas de la première expérience).

B. — ESSAI D'INTERPRÉTATION DU MÉCANISME RÉACTIONNEL

L'étude cinétique de la condensation glycocolle-azide pyridique n'a pu être effectuée quantitativement avec une grande précision puisque les mesures densitométriques donnent une erreur voisine de 10 p. 100. Dans la mesure où cette incertitude expérimentale permet de tirer une conclusion, on peut dire que la réaction semble être du premier ordre.

Les constantes de vitesse trouvées sont :

— pour l'azide picolique à $p\mathrm{H} = 8{,}50$ (22° C) en proportion stoechiométrique
$k = 0{,}066\ \mathrm{min}^{-1}$ (hydrolyse : $k = 0{,}028\ \mathrm{min}^{-1}$).

— pour l'azide nicotique à $p\mathrm{H} = 8{,}50$ (22° C) en proportion stoechiométrique
$k = 0{,}0192\ \mathrm{min}^{-1}$ (hydrolyse : $k = 0{,}0089\ \mathrm{min}^{-1}$).

Qualitativement, les résultats généraux sont les suivants :
— en présence d'un excès d'azide, la condensation s'accompagne d'hydrolyse de ce produit.

Les vitesses de condensation sont, toutes conditions égales par ailleurs, en général plus élevées que les vitesses correspondantes d'hydrolyse (seule) et varient dans le sens :

azide picolique > *iso*nicotique > nicotique

— en proportion stoechiométrique, seule la réaction de condensation se manifeste pratiquement et l'on observe le même ordre de réactivité des trois isomères.

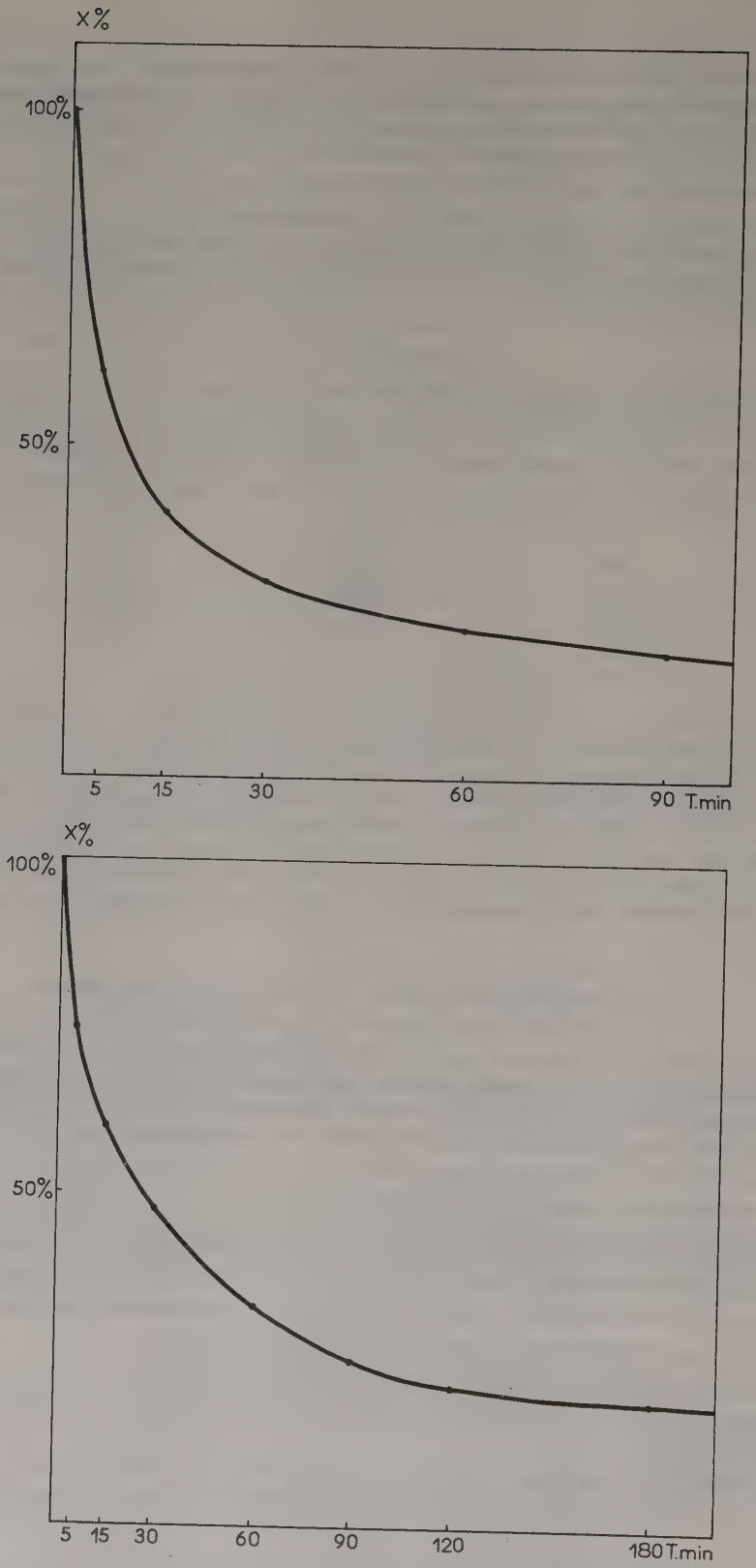


FIGURE 14

Réaction du glycocolle avec les azides picolique (en haut) et nicotique (en bas).
Disparition du glycocolle en fonction du temps.

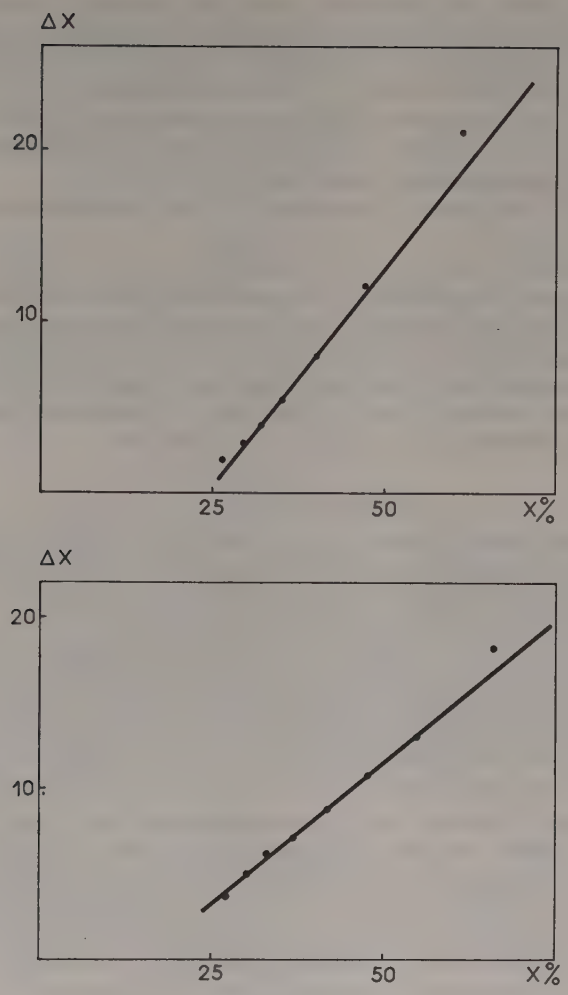
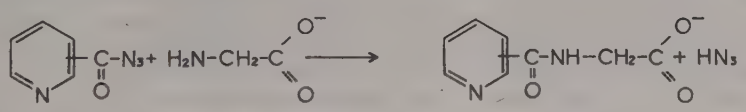


FIGURE 15

Réaction du glycocolle avec les azides picolique (en haut) et nicotique (en bas). Détermination de l'ordre de la réaction.

— d'une manière générale, les vitesses de condensation augmentent avec le *p*H; on peut admettre le schéma suivant :



La formation du produit de condensation implique la libération d'acide azothydrique, libération qui s'effectuera plus facilement en milieu alcalin. D'autre part, en milieu aqueux neutre, l'amino-acide se trouve sous la forme d'un zwitterion, forme dans laquelle la réactivité du groupement aminé s'avère masquée par le groupement carboxylique voisin. La forme zwitterion, en milieu alcalin, se trouve remplacée par l'anion aminoacide dont la fonction aminée n'est pratiquement pas ionisée.

La présence du groupement carboxylique joue de plus un rôle de premier plan dans la réactivité de la fonction amine. Nous avons en effet essayé de reproduire la condensation précédente en mettant en présence les différents azides pyridiques avec l'éthyla-

mine, amine qui ne diffère du glycocolle que par le remplacement du groupement — COOH par un groupement méthyle. Dans aucun cas, nous n'avons pu mettre en évidence de produit de condensation, tandis que la réaction à la ninhydrine montrait la persistance de l'amine aliphatique dans le milieu réactionnel.

Cependant, l'intervention des ions OH^- ne constitue pas le stade prépondérant de la réaction, puisqu'on note des vitesses de réaction nettement différentes pour la condensation de l'azide avec le glycocolle et pour son hydrolyse.

Dans notre milieu réactionnel interviennent donc simultanément deux réactions parallèles :

$$\text{Azide} + OH^- \rightarrow \text{complexe} \rightarrow \text{acide}$$
$$\text{Azide} + \text{acide aminé} \rightarrow \text{produit de condensation}$$

la seconde réaction étant plus rapide. C'est ce qui explique que, dans les processus où l'azide est en excès, par rapport à l'amine, la réaction d'hydrolyse puisse se manifester, et d'autant plus rapidement que l'isomère considéré s'hydrolyse plus vite. Il n'en est plus de même dans les réactions stoechiométriques où la majeure partie de l'azide est consommée par la condensation plus rapide que l'hydrolyse.

Partie expérimentale

L'azide est dissous dans 1 ml de dioxanne. L'acide aminé, mis en solution dans 2 ml d'une solution tampon borate de pH désiré, est additionné de 0,5 ml de la solution dioxannique précédente. La concentration finale en glycocolle est, quelque soit l'essai, de $2{,}7 \times 10^{-2}$ M; en azide elle est soit de $2{,}7 \times 10^{-2}$ M soit de $5{,}4 \times 10^{-2}$ M. Le mélange est laissé à température ambiante (22 - 24 °C).

Des prélèvements sont faits à des intervalles de temps déterminés.

Les spots sont réalisés avec 20 µl du mélange envisagé. Pour chaque essai nous avons fait, suivant le révélateur chromatographique utilisé ultérieurement, soit un témoin acide pyridine-monocarboxylique et un témoin produit de condensation correspondant à l'isomère étudié, soit un témoin glycocolle, dans les mêmes conditions expérimentales. On sait en effet l'importance de l'effet de sel dans la modification des R_f d'un composé chimique quel qu'il soit : or nous opérons avec des tampons de concentration saline différente.

Nous avons utilisé la technique ascendante sur papier Whatman n° 1 à la température ambiante. Le solvant chromatographique est celui qui nous a servi dans l'étude de la réaction d'hydrolyse : butanol tertiaire - eau (8 : 2, v/v).

Les révélateurs sont, soit le bromure de cyanogène et benzidine, soit la ninhydrine. Dans le dernier cas nous avons réalisé des dosages des quantités de glycocolle non disparu, c'est-à-dire la quantité de bleu Ruhemann formé après un temps variable à l'aide d'un densitomètre (*). Le papier est rendu transparent par immersion dans une huile minérale légère. La formation de bulles est évitée par dégazage sous vide. Nous avons pris un cache de 12 mm correspondant à la largeur des taches. Ces taches ont défilé dans le sens de la hauteur, devant une fente de 1 mm de large. Nous avons intégré les courbes obtenues en prenant pour ligne de base le papier vierge placé en avant et en arrière des taches et qui a été soumis au même traitement.

II. — PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DE QUELQUES N-ISONICOTYLAMINOACIDES

On sait depuis longtemps que certains acides organiques ne s'éliminent de l'organisme qu'après avoir subi une conjugaison avec le glycocolle. Ainsi, en 1912, Ackerman [2] a le premier isolé un 3-pyridoylaminoacide, qu'il a appelé acide nicotinurique, à partir de l'urine d'un chien auquel il avait fait ingérer de l'acide nicotique. La première synthèse de ce métabolite n'a été réalisée qu'en 1930 par Meyer & Graf [124]. Elle a été reprise plus tard par Fox et Field [72], puis par Rohrlich [149], qui y apportèrent des modifications. Avec la découverte des propriétés antituberculeuses de l'isoniazide ou hydrazide *iso*nicotique [15, 87] en 1951, l'attention des chercheurs a de nouveau été attirée sur les dérivés pyridiques des acides aminés. C'est ainsi que dans le but de rendre les substances tuberculostatiques plus semblables à des produits naturels et de ce fait moins toxiques, Gardner et coll. [75] ont été amenés à fixer des acides aminés sur le noyau pyridique en position γ. Ils ont préparé les premiers les N-*iso*nicotyl-glycocolle, *iso*leucine et -phénylalanine. Nous avons effectué la synthèse de trois nouveaux représentants de cette série.

(*) Il s'agit de l'appareil commercialisé par " Locarte " Cie, Londres et habituellement utilisé pour la densitométrie des électrophorégrammes.

Nous décrirons dans cette section :
— la préparation des dérivés pyridiques antérieurement connus et nouvellement préparés;
— leurs caractéristiques spectrales;
— leurs caractéristiques chromatographiques.

A. — SYNTHÈSE DE QUELQUES N-ISONICOTYLAMINOACIDES

La synthèse est calquée sur la technique utilisée par Rohrlich [149] pour la préparation de l'acide nicotinurique et est valable à peu de chose près pour tous les composés. Les produits obtenus se présentent sous la forme de cristaux incolores. Leur analyse élémentaire a été faite par le service de microanalyses du C.N.R.S. (*). Les teneurs en C, H et N sont rassemblées dans un tableau général (tableau X). Les résultats de l'électrotitration montrent également que la pureté des produits est satisfaisante. Les points de fusion ont été pris au microscope à point de fusion (**).

N-*iso*nicotylglycocolle (acide *iso*nicotinurique)

A 3,75 g de glycocolle dissous dans 50 ml de NaOH N on ajoute petit à petit en agitant et en refroidissant 7,50 g d'azide. Nous avons préféré la soude N à une soude 0,01 N [75] pour la dissolution du glycocolle car l'addition de l'azide avait, dans le dernier cas, entraîné une précipitation d'acide *iso*nicotique. Il est nécessaire d'ajouter au cours de la journée, et par petites fractions, 50 ml de NaOH N pour que le mélange reste constamment alcalin. Après un repos d'une nuit, la solution est évaporée à siccité au B.M. ; le résidu, repris par 25 ml d'HCl 2N, est additionné de 100 ml d'une solution de $CuSO_4$ à 20 p. 100. Le précipité formé est abandonné au repos plusieurs heures, filtré, mis en suspension dans un excès d'eau bouillante (300 ml environ) et traité par un courant d'H_2S jusqu'à décoloration complète du mélange réactionnel. Après filtration du précipité noir de CuS, la solution incolore est concentrée sous vide. Des cristaux se séparent par refroidissement. Le produit est recristallisé dans l'eau.

Rendement = 1,80 g F = 230° C.

Nous avons obtenu un deuxième échantillon qui cristallisait avec une demie molécule d'eau.

TABLEAU X

POIDS MOLÉCULAIRE ET ANALYSE ÉLÉMENTAIRE DE DIVERS N-*iso*NICOTYLAMINOACIDES

PRODUITS	CALCULÉ				TROUVÉ			
	P.M.	C°/°	H°/°	N°/°	P.M.	C°/°	H°/°	N°/°
N-*iso*nicotyl-glycocolle	180,15	50,79	4,79	14,50	180,18	50,72	4,90	14,88
N-*iso*nicotyl-DL-*iso*leucine	236,25	61,00	6,82	11,85	235,29	61,22	6,72	12,03
N-*iso*nicotyl-DL-phénylalanine .	270,27	66,65	5,22	10,36	271,23	66,93	5,30	10,45
N-*iso*nicotyl-DL-alanine	194,18	55,57	5,10	14,42	196,00	55,75	5,24	14,56
N-*iso*nicotyl-DL-valine	222,23	59,44	6,35	12,60	222,22	59,42	6,50	12,61
N-*iso*nicotyl-DL-leucine	236,25	58,75	6,98	11,42	242,87	58,73	7,71	11,56

N-*iso*nicotyl-DL-*iso*leucine

Sa synthèse est pratiquement semblable à celle de l'acide *iso*nicotinurique, mais le résidu résultant de l'évaporation à siccité du mélange alcalin est repris par l'eau au lieu d'HCl 2N ; ce sera d'ailleurs le cas de tous les autres N-*iso*nicotylaminoacides que nous avons préparés.

Nous avons obtenu 3,20 g de produit à partir de 6,50 g de DL-*iso*leucine.

(*) Que nous sommes heureuse de remercier ici (Service de microanalyses, 39 *bis*, rue de Dantzig, Paris-15e).

(**) Microscope Reichert.

Recristallisation dans l'éthanol aqueux.

F = 200 °C

N-*iso*nicotyl-DL-phénylalanine

La phénylalanine (6,5 g) a donné 3,90 g de dérivé N-*iso*nicotylé.

Recristallisation dans l'éthanol aqueux.

F = 185 °C

Signalons que le produit de Gardner fondait à 230 °C.

N-*iso*nicotyl-DL-alanine

3,60 g de DL-alanine ont permis d'obtenir 1,20 g de N-*iso*nicotylalanine.

Recristallisation dans l'éthanol aqueux.

F = 220 °C

N-*iso*nicotyl-DL-valine

Nous avons obtenu 1,60 g de N-*iso*nicotylvaline à partir de 4,70 g de DL-valine.

Recristallisation dans l'éthanol aqueux.

F = 185 °C

N-*iso*nicotyl-DL-leucine

La DL-leucine (5,50 g) a donné 2,90 g de produit cristallisant à une demie molécule d'H_2O.

Recristallisation dans l'éthanol aqueux.

F = 165 °C

B. — SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

La concentration des solutions que nous avons étudiées est de 10^{-4} M. Nous n'avons pu conserver la concentration de 5,4 exprimée en moles/l $\times$ 10^{-5} que nous avions utilisée précédemment car elle ne nous permettait pas d'obtenir un tracé caractéristique du spectre de certains des composés. Le solvant utilisé est l'eau distillée. Le *p*H des solutions a été uniformisé à 4,25, c'est-à-dire sur celui de la solution d'acide nicotinurique à la concentration de 10^{-4} M au moyen d'HCl 0,1 N.

Il nous a paru intéressant de comparer le spectre de nos composés à celui de l'acide dont ils dérivent et à celui de l'amide et de l'hydrazide correspondants. Outre les spectres des acides dont nous avons parlé précédemment, certains d'entre eux sont déjà connus, en particulier ceux de l'hydrazide *iso*nicotique [129, 101] et des amides [104, 101].

Comme le montre la figure 16 le remplacement de l'hydroxyle-OH par la fonction -NH_2 ne modifie pas la longueur d'onde du maximum. Il en est de même lorsque le groupement -OH est substitué par la fonction hydrazide -NH-NH_2 ou par un radical amino-acide. Cette persistance du sommet à une longueur d'onde déterminée était prévisible. Nous savons en effet qu'une accumulation de chromophores en position contiguë ne donne en général pas lieu à des déplacements des maximums. On aurait pu cependant penser que l'introduction d'un second groupement -COOH (cas des N-pyridoylamino-acides) amènerait un effet bathochrome comme cela s'est produit lors du remplacement d'un H du noyau par la fonction -COOH. Cet effet bathochrome résultant de l'introduction d'un groupement présentant une double liaison -C = O est général et s'accentue même lorsque deux fonctions acides se trouvent liées au noyau. En réalité Kiss et Muth [108] ont montré que le glissement est minime lorsque le deuxième groupement -COOH introduit est séparé du noyau, ce qui est le cas de tous les dérivés N-pyridoylaminoacides. Ce fait se conçoit facilement : il est admis actuellement que les effets batho-

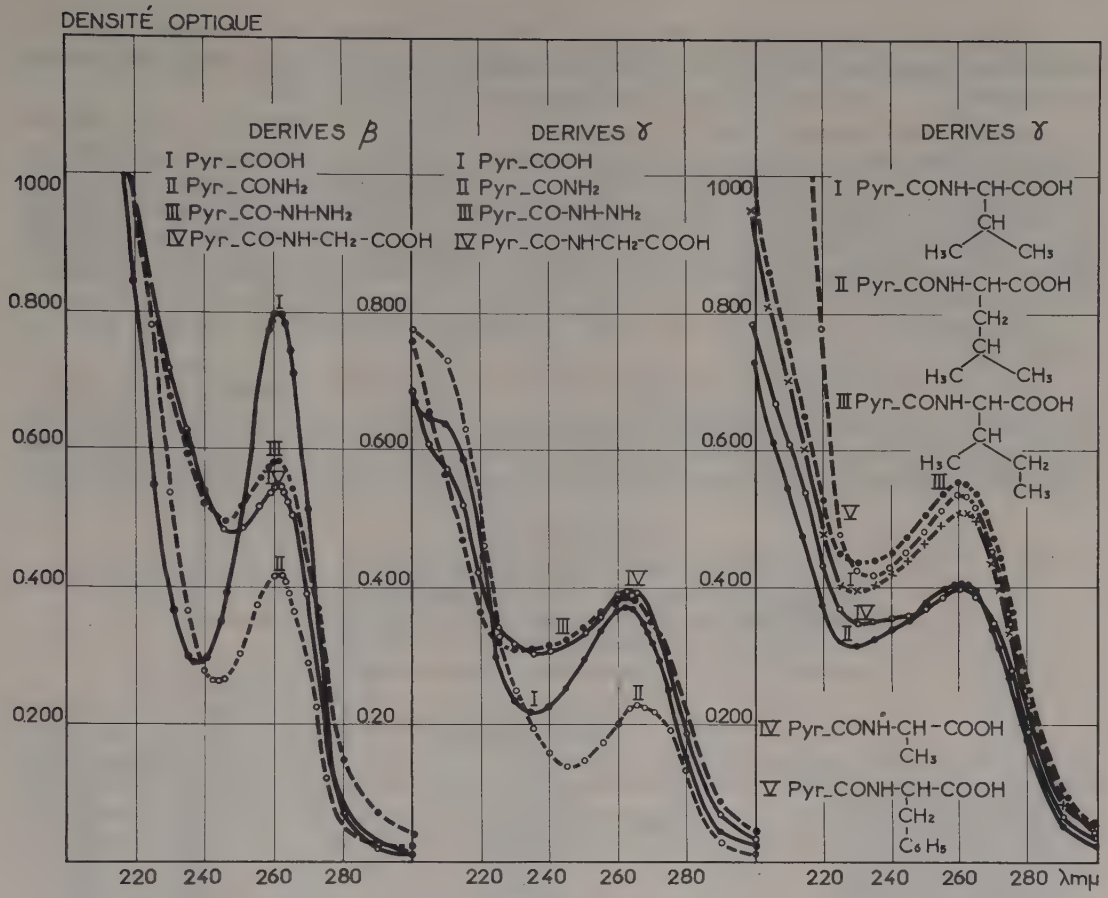


FIGURE 16

Spectres d'absorption dans l'ultra-violet de divers dérivés pyridiques.

chromes sont en relation avec les structures de résonance qui s'établissent entre le noyau et le groupement carbonyle -C=O. Un groupement carbonyle -C=O séparé du noyau par un ou plusieurs radicaux -CH_2 aura une influence pratiquement nulle sur la résonance du noyau auquel il est lié.

Si la longueur d'onde n'est pas affectée par une substitution, il n'en est pas de même de l'allure générale de la courbe. On assiste à un affaissement d'ensemble de la bande d'absorption, particulièrement sensible dans le cas des hydrazides et des N-pyridoylaminoacides, le creux est moins prononcé et le massif qui le suit est également plus faible. Ce phénomène est en relation avec l'accroissement du poids moléculaire du composé.

C. — IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

CUTHBERTSON et coll. [52], ZAMBONI et DEFRANCESCHI [181] caractérisaient par chromatographie les pyridoylaminoacides, métabolites résultants de la transformation de l'isoniazide, à partir de l'urine humaine et de l'urine de rat. Ils utilisaient divers solvants. Après une expérimentation de solvants variés, nous avons préféré le solvant constitué de 8 parties de butanol tertiaire pour 2 parties d'eau que nous avions utilisé pour mettre en évidence la réaction d'hydrolyse et qui nous a permis d'obtenir des R_f bien différenciés. Nous avons opéré en technique ascendante, sur papier Whatman n° 1 et à la température ambiante (27 °C).

La révélation des spots est effectuée à l'aide du bromure de cyanogène et de la benzidine. Rappelons que la ninhydrine ne donne aucune réaction avec les dérivés pyridiques.

Les différents composés ont été comparés aux acides dont ils dérivent et aux hydrazides et amides correspondants. Ils ont été étudiés en solution aqueuse simple dont le *p*H oscillait entre 4,25 et 4,85 pour les acides et les N-pyridoylaminoacides, entre 6,50 et 6,70 pour les hydrazides et les amides. Nous avons également réalisé des expériences dans lesquelles les produits ont été dissous en tampon phosphate de Sörensen de $pH = 7,00$ et dans le milieu de Youmans de $pH = 7,00$ (milieu que nous utiliserons pour les essais de nutrition azotée).

Les différentes valeurs de R_f et les colorations obtenues sont réunies dans le tableau XI.

Il ressort en premier lieu du tableau XI que les séries β et γ présentent des teintes différentes, ne faisant que confirmer ainsi ce que nous avons dit lors de l'étude de la réaction d'hydrolyse et de la réaction sur la fonction amine. Mis à part les hydrazides dont l'un, le dérivé γ, a une teinte jaune pâle, l'autre une coloration jaune orangé pâle,

TABLEAU XI

VALEURS DES R_f DES DÉRIVÉS γ ET β

Solvant : butanol tertiaire - eau (8 : 2), papier Whatman n° 1.
Technique ascendante, coloration obtenue à partir de $7,4 \times 10^{-4}$ mM de produit (20 µl d'une solution à 3,7 mM p. 100).

SUBSTANCES	COLORATION AVEC BrCN + BENZIDINE	VALEURS DES R_f		
		SOL. AQUEUSE	TAMPON PHOSPHATE $pH = 7,00$	MILIEU YOUMANS $pH = 7,00$
Hydrazide *iso*nicotique	jaune pâle	0,69	0,79	0,70
Acide *iso*nicotique	bleu violacé devenant mauve	0,51	0,48	0,30
N-*iso*nicotylglycocolle (acide *iso*nicotinur.)	mauve	0,44	0,36	0,23
N-*iso*nicotyl-DL-*iso*leucine	mauve	0,68	0,68	0,53
N-*iso*nicotyl-DL-leucine	mauve	0,69	0,69	0,53
N-*iso*nicotyl-DL-valine	mauve	0,80	0,62	0,45
N-*iso*nicotyl-DL-alanine	mauve	0,52	0,52	0,31
N-*iso*nicotyl-DL-phénylalanine	mauve	0,67	0,60	0,50
Amide *iso*nicotique	mauve	0,78	0,78	0,78
Hydrazide nicotique	jaune orange pâle	0,69	0,79	0,70
Acide nicotique	orangé devenant rose	0,51	0,42	0,29
N-nicotylglycocolle (*) (acide nicotinur.)	rose	0,44	0,36	0,20
Amide nicotique	rose	0,77	0,85	0,78

(*) Ce produit provient de la firme Calbiochem, Los Angeles.

comme le signalaient d'ailleurs CUTHBERTSON et coll. [52], la série β montre une teinte allant du rose orangé au rose, la série γ du bleu violacé au mauve. Nous avons vérifié qu'avec des solutions plus concentrées les N-*iso*nicotylaminoacides ne présentent aucune différence perceptible de coloration par rapport à l'acide dont ils dérivent. Après quelques minutes d'ailleurs les teintes s'unifient dans leur gamme respective. En accord avec CUTHBERTSON et coll. il faut noter la similitude totale des R_f des dérivés *ortho* et de leurs isomères *méta* lorsqu'ils sont en solution aqueuse ou même dans le tampon phosphate. Cependant comme nous l'avons vu lors de l'étude de la réaction de l'azide sur la fonction amine, à $pH = 9,15$ en solution tampon borate les acides *iso*nicotique et *iso*nicotinurique accusaient des différences très appréciables par rapport à leurs isomères β. Nous savons en effet qu'un des facteurs les plus importants de la modification des R_f est « l'effet de sel ». Pour cette raison nous avons tenu à établir le R_f de ces composés dans un milieu contenant un certain nombre de sels divers comme c'est le cas du milieu de Youmans qui sera utilisé lors des essais bactériologiques de ces substances. L'étude du tableau XI vérifie que le R_f de certains des composés est sensible à la fois au *p*H et au solvant. La modification du R_f est particulièrement appréciable pour les dérivés possédant une fonction acide.

III. — ESSAIS BACTÉRIOLOGIQUES SUR QUELQUES N-ISONICOTYLAMINOACIDES

En raison de la présence du noyau pyridique dans la structure de nombreux tuberculostatiques modernes (isoniazide, mercator, etc...), il était évidemment intéressant d'étudier le comportement, vis-à-vis des mycobactéries, des N-*iso*nicotylaminoacides dont nous avions fait la synthèse. Par ailleurs nous avons étendu nos recherches à d'autres souches microbiennes en examinant si ces composés étaient susceptibles de se comporter comme une source d'azote possible pour leur développement.

A. — ACTION DE QUELQUES N-ISONICOTYLAMINOACIDES SUR LA POUSSE DU B.C.G.

Nous avons choisi le B.C.G. comme matériel de travail parce que ce germe qui représente une mycobactérie typique, dont la sensibilité vis-à-vis des tuberculostatiques est très comparable à celle des souches pathogènes, est de manipulation beaucoup plus aisée en raison de son absence de virulence.

Le milieu de culture sur lequel nous avons fait nos essais est le milieu de Youmans dont la composition est la suivante pour 100 ml :

Asparagine	0,50 g
Phosphate monopotassique	0,50 g
Sulfate neutre de potassium	0,05 g
Glycérol	2 g
Citrate de magnésium	0,15 g

Le citrate de magnésium est ajouté en dernier lieu après dissolution totale à chaud des autres sels, refroidissement du milieu et ajustement à pH = 7,00. Le milieu est réparti en tubes courts et larges (22 cm de diamètre) à raison de 7 ml par tube d'expérimentation du produit et 9 ml par tube témoin. On stérilise à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes.

Avant l'emploi, il faut ajouter dans tous les tubes 1 ml de sérum de cheval stérilisé par filtration et dans les tubes d'expérimentation 2 ml d'une solution de la substance étudiée filtrée sur filtre Seitz et à la concentration de $2{,}5 \times 10^{-5}$ moles pour 100 ml de milieu de Youmans.

L'influence des N-*iso*nicotylaminoacides a été comparée à celle de l'hydrazide de l'acide *iso*nicotique (I.N.H.), substance à propriétés bactériostatiques bien connues. La concentration choisie pour notre étude correspond à 68,5 µg d'I.N.H. par ml.

Nous avons ensemencé six tubes pour chaque milieu, trois avec 0,25 ml d'une suspension de 100 germes au ml, trois avec 0,25 ml d'une suspension de 10 germes au ml.

Ces suspensions se préparent par dilutions successives d'une suspension mère (solution A) sachant que 1 mg de B.C.G. correspond à 40 000 000 de germes [24]. La solution A est obtenue par broyage au mortier d'une culture de B.C.G. sur pomme de terre, prélevée stérilement et soigneusement séchée entre deux feuilles de papier buvard, puis pesée dans une boîte de Pétri.

Les lectures ont été faites après les 9, 13, 17, 20 et 29e jours. Le B.C.G. se développe sous forme de petites colonies en suspension dans le milieu liquide et qu'il est facile de compter. Des examens au microscope et des repiquages sur milieu de Jensen (*) pour les tubes à culture douteuse ont été pratiqués. Dans le tableau XII sont rassemblés les résultats.

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'examen de ce tableau sont les suivantes :

— par rapport au témoin qui ne contient que du milieu de Youmans, les N-*iso*nicotylaminoacides semblent présenter une activité antibactérienne certaine. Elle varie sui-

(*) Milieu solide au vert malachite dérivant du milieu de Loewenstein.

vant les produits, la plus forte étant l'apanage du dérivé du glycocolle, la plus faible celui du dérivé de l'alanine.

— si nous rapprochons leur activité de celle de l'I.N.H., nous voyons qu'elle n'a rien de comparable. Rappelons en effet que l'I.N.H. agit à des doses extrêmement faibles, inférieures à 1 μg/ml.

Ce faible pouvoir tuberculostatique provient vraisemblablement du noyau hétérocyclique inclus dans la molécule de nos N-*iso*nicotylaminoacides. Nous avons en effet effectué une nouvelle expérience dans laquelle nous avons comparé, sur le B.C.G., l'effet du plus actif de nos N-*iso*nicotylaminoacides, le N-*iso*nicotylglycocolle, avec le simple sel de sodium de l'acide pyridine-γ-carboxylique. Nous avons observé, avec les deux produits, le même retard à la pousse par rapport aux tubes témoins et le même nombre de colonies après 20 jours de culture. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de Gardner et coll. [75] qui ont testé sur la souris trois dérivés isonicotylés et dont ils ont montré l'inefficacité thérapeutique.

Nous n'avons donc pas poussé plus loin ces investigations, ces dérivés ne présentant pas d'intérêt pratique dans ce domaine.

TABLEAU XII

CULTURES DE B.C.G. SUR MILIEU DE YOUMANS EN PRÉSENCE DE N-*iso*NICOTYLAMINOACIDES

MILIEUX	NOMBRE DE GERMES ENSEMENCÉS	RÉSULTATS MACROSCOPIQUES APRÈS 13 JOURS DE CULTURE	RÉSULTATS MACROSCOPIQUES APRÈS 20 JOURS DE CULTURE	EXAMENS MICROSCOPIQUES
Témoin	100	+++	++++ 500 col.	+
	10	++	+++ 100 col.	+
I.N.H.	100	0	0	0
	10	0	0	0
N-*iso*nicotylglycocolle	100	0	±	+
	10	0	±	+ germes rares
N-*iso*nicotyl-DL-valine	100	±	++ 20 à 25 col.	+
	10	±	+ 5 col.	+
N-*iso*nicotyl-DL-alanine	100	++	+++ 100 col.	+
	10	+	+++ 100 col.	+
N-*iso*nicotyl-DL-*iso*leucine	100	++	++ 50 col.	+
	10	+	+ rares col.	+
N-*iso*nicotyl-DL-leucine	100	+	+ 5 à 10 col.	+
	10	±	+ 2 à 3 col.	+
N-*iso*nicotyl-DL-phénylalanine .	100	0	+ 5 à 10 col.	+
	10	0	+ 2 à 5 col.	+

B. — ESSAIS SUR LE MÉTABOLISME DE QUELQUES N-ISONICOTYLAMINOACIDES PAR DIVERSES ESPÈCES MICROBIENNES

La nutrition bactérienne est un domaine qui ne nous est pas étranger, puisqu'en 1945 [77] déjà notre regretté Maître, Monsieur le Professeur Lasseur de la Faculté de Pharmacie de Nancy, avait orienté nos recherches de thèse de doctorat en pharmacie sur l'influence des acides aminés, source d'azote, dans le développement et la chromogénèse de certaines bactéries.

Nous ne referons pas ici l'historique de cette question, si nombreux ont été les chercheurs qui ont travaillé sur ce problème et si diverses les techniques utilisées pour aborder l'étude du métabolisme azoté microbien. Précisons seulement que des germes sont capables de se multiplier dans un milieu synthétique dont l'unique substrat est constitué par un aminoacide et la découverte de la chromatographie de partage a permis à certains auteurs [146, 174, 53, 117, 105, 40, 177] de montrer qu'au développement de

la culture microbienne correspond une diminution progressive et dans certains cas totale de l'aminoacide en même temps qu'apparaissent de nouvelles substances facilement identifiables, pour la plupart des aminoacides.

Les recherches expérimentales de Césaire et coll. [29 à 32] sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella paratyphi* B, effectuées dans notre laboratoire, ont permis à ces chercheurs de préciser le processus de transformation de l'acide aminé. Ces auteurs pensent que le premier stade de modification de l'aminoacide serait une désamination directe ou après transamination, réalisée grâce aux acidaminodéhydrases que contient le corps bactérien et qui libéreraient ainsi dans le milieu de culture des acides α-cétoniques et de l'ammoniaque. C'est à partir des ions ammonium et des acides α-cétoniques que seraient synthétisés, par l'action réversible de ces enzymes, l'acide glutamique, l'alanine et l'acide aspartique. Puis, par des réactions de transamination, ces composés donneraient naissance à d'autres acides aminés.

Nous avons pensé qu'il était d'un certain intérêt de voir le rôle qu'était susceptible de jouer, dans la nutrition azotée, un acide aminé dont la fonction amine était bloquée en particulier par un groupement pyridoyle et plus spécialement nicotyle dont on connaît la valeur de facteur de croissance sous la forme de nicotamide.

1° *Protocole expérimental*

Les milieux de culture sont ceux utilisés par Césaire et coll. [30]. Ils dérivent du milieu de Youmans et renferment pour 100 ml :

Aminoacide	3,7 mM
Phosphate acide de potassium	500 mg
Sulfate neutre de potassium	50 mg
Glycérol	2 g
Citrate de magnésium	150 mg
Solution de microéléments	0,1 ml

La solution de microéléments est composée de :

HNO_3, 18 N	30 ml
LiCl	0,5 g
$CuSO_4$, $5\,H_2O$	1 g
$ZnSO_4$, $6\,H_2O$	0,5 g
Na_2SO_4	0,5 g
$K_2Cr_2O_7$	0,2 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4\,H_2O$	0,5 g
Eau distillée q.s.p.	18 l

Les milieux sont ajustés à $pH = 7{,}00$ puis répartis en tube à raison de 10 ml de milieu et stérilisés à l'autoclave à 120°. Les tubes sont ensemencés avec une goutte d'une suspension en Youmans d'une culture de 24 h d'un germe déterminé. Au 5e jour et au 12e jour, 1 ml de culture est prélevé stérilement, centrifugé et le liquide surnageant (20 µl) étudié en technique descendante sur papier Whatman n° 1 avec le solvant n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1 : 2 : 1) avec révélation à la ninhydrine (solution à 0,2 p. 100 dans le n-butanol saturé d'eau) pour les milieux à acides aminés non substitués et à N-pyridoyl-aminoacides. Pour ces derniers on pratique en outre une chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 avec le solvant butanol tertiaire/eau (8 : 2) avec révélation au bromure de cyanogène et à la benzidine.

2° *Résultats*

Trois séries d'expériences ont été conduites.

Première expérience :

Le premier essai a porté sur *Pseudomonas aeruginosa* (souche Dakar) et *Salmonella paratyphi* B que nous avons cultivés sur différents milieux.

Nous avons groupé dans le tableau XIII l'ensemble des résultats expérimentaux.

Toutes les cultures négatives ou douteuses (±) ont été repiquées sur gélose le 3e et le 12e jour, puis au bout d'un mois. Les germes se sont montrés vivants dans tous les milieux sauf dans le milieu contenant du glycocolle et du picolate de sodium dans le cas de *Salmonella paratyphi* B.

La révélation des chromatogrammes par la ninhydrine a mis en évidence, pour ces deux germes, dans tous les milieux contenant l'acide aminé naturel en présence ou non du sel de sodium des trois acides pyridine-monocarboxyliques, la gamme des acides aminés que signalent Césaire et coll. [30] sauf dans le cas de *S. paratyphi* B en présence de glycocolle et de picolate de sodium où l'on retrouve intégralement le glycocolle. Dans les milieux à N-pyridoylamino-acides aucun spot ninhydrine positif n'apparaît. Par contre, la révélation au bromure de cyanogène et à la benzidine montre les spots à teinte et R_f caractéristiques de ces divers composés.

TABLEAU XIII

CULTURE DE *Pseudomonas aeruginosa* ET DE *Salmonella paratyphi* B EN PRÉSENCE DE DIVERS ACIDES AMINÉS ET DE LEUR HOMOLOGUE À FONCTION AMINE BLOQUÉE

ACIDES AMINÉS		*Pseudomonas aeruginosa*				*Salmonella paratyphi* B			
		Age des cultures				Age des cultures			
		1 jour	2 jours	3 jours	10 jours	1 jour	2 jours	3 jours	10 jours
Néant	C (*) P (*)	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
Glycocolle	C P	+ 0	++ +	+++ ++	++++ +++	±	±	±	+
Glycocolle + isonicotate de sodium	C P	+ 0	+ ++++	++ ++++	+++ ++++	±	±	±	++ léger voile
Glycocolle + nicotate de sodium	C P	+ 0	++ +	++ ++	+++ ++++	±	±	±	++ léger voile
Glycocolle + picolate de sodium	C P	— 0	++ +	++ +++	+++ ++++	0	0	0	0
N-isonicotyl-glycocolle	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
N-nicotyl-glycocolle	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
DL-alanine	C P	+ 0	++ +	+++ ++	+++ +++	±	±	±	±
N-isonicotyl-DL-alanine	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
DL-phénylalanine	C P	+ 0	++ +	+++ ++	+++ +++	±	±	±	±
N-isonicotyl-DL-phénylalanine	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
DL-leucine	C P	± 0	+ 0	+ 0	+ 0	±	±	±	±
N-isonicotyl-DL-leucine	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
DL-isoleucine	C P	± 0	+ 0	++ 0	++ 0	±	±	±	±
N-isonicotyl-isoleucine	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±
DL-valine	C P	+ 0	++ +	+++ ++	+++ ++	±	±	±	±
N-isonicotyl-DL-valine	C P	± 0	± 0	± 0	± 0	±	±	±	±

(*) C = culture
P = pigment

Sans vouloir à présent discuter l'ensemble de ces résultats, nous pouvons dire cependant que *Ps. aeruginosa* aussi bien que *S. paratyphi* B n'utilisent pas les N-pyridoylamino-acides pour leur multiplication. Cette inaptitude à se développer sur milieu synthétique avec comme seule source d'azote un acide aminé à fonction amine bloquée est-elle le fait de ces deux germes, ou se généralise-t-elle ? Ce fut le but de notre deuxième essai.

Deuxième expérience :

Les germes suivants ont été cultivés sur milieu renfermant soit du glycocolle, soit de l'acide nicotinurique, soit de l'acide *iso*nicotinurique :

Bacillus subtilis
Salmonella typhi
Cloaca cloacae
Sarcina (non identifiée)

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XIV

CULTURE DE DIVERS GERMES EN PRÉSENCE DE GLYCOCOLLE OU DE SES DÉRIVÉS PYRIDIQUES

ACIDES AMINÉS	*Bacillus subtilis*			*Salmonella typhi*			*Cloaca cloacae*			*Sarcina*		
	Age des cultures			Age des cultures			Age des cultures			Age des cultures		
	1 j.	4 j.	10 j.	1 j.	4 j.	10 j.	1 j.	4 j.	10 j.	1 j.	4 j.	10 j.
Glycocolle	0	0	0	+	+	++	+++	++++	++++	±	±	±
Ac. nicotinurique ..	0	0	0	±	±	±	0	0	0	0	0	0
Ac. isonicotinurique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les ensemencements pratiqués sur gélose à partir des tubes à culture douteuse ou négative se sont révélés positifs le 10e jour et au bout d'un mois.

Le glycocolle a été retrouvé intégralement dans le milieu où furent ensemencés *B. subtilis* et *Sarcina*.

Par contre, parallèlement au catabolisme de l'acide aminé initial, on observe dans les cultures de *S. typhi* et de *Cloaca cloacae,* l'apparition de nouveaux spots ninhydrine positifs que nous avons identifiés à la sérine, thréonine et alanine pour le premier, et, pour le second, à ces mêmes acides aminés auxquels s'ajoute la valine.

De plus, quelque soit le germe considéré, acide *iso*nicotinurique et nicotinurique se retrouvent intégralement dans le milieu.

Troisième série d'expériences :

Pour le troisième essai nous avons choisi un germe particulièrement sensible à un acide déterminé. *Ps. aeruginosa,* dont le développement est favorisé par la présence de glycocolle, nous a semblé être le germe le mieux approprié à cette expérience. Nous l'avons cultivé sur milieu synthétique contenant des quantités décroissantes de glycocolle allant de 100 p. 100 de la quantité normale à 0 p. 100 et des quantités croissantes de son homologue à fonction amine bloquée, en particulier l'acide nicotinurique, allant de 0 à 100 p. 100 de cette quantité standard. Nous avons naturellement fait comparativement la même expérience en remplaçant la solution d'acide nicotinurique par la solution mère ne comportant aucun élément azoté.

Des tubes contenant 6 ml de solution mère sont complétés à 10 ml :
— avec des quantités décroissantes de solution de glycocolle de concentration appropriée;
— avec des quantités croissantes soit de la solution mère, soit d'une solution d'acide nicotinurique de concentration déterminée.

Ces solutions ont été filtrées sur filtre Seitz après avoir été ajustées à pH = 7,00. Le tableau XV groupe les résultats de cet essai.

TABLEAU XV

CULTURE DE *Pseudomonas aeruginosa* EN PRÉSENCE DE GLYCOCOLLE ET DE *N*-NICOTYLGLYCOCOLLE EN QUANTITÉ VARIABLE

NUMÉRO DES TUBES		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
NOMBRE DE JOURS	GLYCOCOLLE	100		90		80		70		60		50		40		30		20		10		0	
	SOLUTION MÈRE		0		10		20		30		40		50		60		70		80		90		100
	ACIDE NICOTINURIQUE	0		10		20		30		40		50		60		70		80		90		100	
1 jour	pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0	0
	développement	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
4 jours	pigment	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	±	+	±	±	0	0
	développement	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	±	±
10 jours	pigment	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	++	++	++	++	+	+	0	0
	développement	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	±	±

Les chiffres indiquent les pourcentages relatifs des différents constituants.

Une investigation des acides aminés après le 4e et le 12e jour de culture n'a pas apporté de résultats valablement interprétables. Nous retrouvons toujours et surtout au 4e jour acide glutamique, acide aspartique, alanine et au 12e jour sérine, thréonine, en quantité notable, mais dès que le pourcentage du milieu en glycocolle est faible, en particulier dans les tubes 8, 9, 10, aucun spot ninhydrine positif n'apparaît. Il est vraisemblable que le glycocolle a donné naissance à d'autres acides aminés mais en trop faible proportion pour être révélés. Naturellement bromure de cyanogène et benzidine mettent en évidence l'acide nicotinurique dans tous les tubes où il est présent.

Nous avons en outre réalisé un dosage de pigment au 12e jour. On sait en effet que *Pseudomonas aeruginosa* élabore dans les milieux de culture deux pigments, la pyocyanine pigment chloroformo-soluble de nature phénazinique, et la bactériofluorescéine, pigment vert hydrosoluble qui donne aux cultures de ce germe leur fluorescence.

Césaire et coll. [29] ont montré, d'une part que la chromogénèse de *Ps. aeruginosa* est non seulement fonction de la nature de la source azotée mais encore de la souche étudiée, et que, d'autre part, le taux de bactériofluorescéine évolue parallèlement à celui de la pyocyanine.

La séparation des pigments est faite de la façon suivante : le liquide de culture est centrifugé et une quantité déterminée, soit 5 ml de liquide surnageant, soumise à une extraction chloroformique (2 ml de $CHCl_3$). La phase aqueuse contient la bactériofluorescéine. Malgré la centrifugation elle est trop trouble pour être justifiable d'un dosage spectrophotométrique. Sa coloration qui varie du jaune pâle au vert est appréciée visuellement. La solution chloroformique de pyocyanine par contre, après une nouvelle centrifugation, est titrée au moyen du spectrophotomètre Unicam SP 500 dans des cuves de 5 mm d'épaisseur. La pyocyanine présente dans le visible un maximum dont nous avons déterminé l'emplacement spectral à $\lambda = 690\text{-}695$ mμ. Nous avons donc étalonné le spectrophotomètre au moyen d'une solution de pyocyanine préparée à partir de pyocyanine chlorhydrate. Pour cela une quantité indéterminée de sel de pyocyanine est traitée par l'eau et la suspension amenée à un *p*H voisin de 9,00 pour faciliter la dissolution du sel. Une extraction chloroformique est alors pratiquée après filtration. La solution chloroformique est desséchée sur $CaCl_2$, puis évaporée à siccité. La solution étalon est préparée à partir de cette pyocyanine base.

Le tableau XVI réunit les résultats du 3e essai. La quantité de pyocyanine est exprimée en milligrammes par litre de culture.

La souche DK locale utilisée, à l'inverse de ce qu'ont obtenu Césaire et coll., fabrique non seulement du pigment hydrosoluble mais aussi de la pyocyanine. Il est d'ailleurs bien connu que les souches de *Ps. aeruginosa* présentent des modifications importantes de leur aptitude chromogénique. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous avons pris un soin particulier d'effectuer chaque série d'expériences d'une manière simultanée. Dans nos conditions expérimentales, la concentration de 3,7 mM p. 100 de glycocolle ne se montre pas la plus favorable à la chromogénèse de *Ps. aeruginosa* : les concentrations environ moitié moindres donnent lieu à la production maximale de pigment. De plus pour pouvoir apprécier le rôle de l'acide nicotinurique dans la diminution notable de pigment que nous observons, nous avons complété cet essai par des dosages de pyocyanine à partir de cultures sur milieu de Youmans modifié (voir p. 49) où l'acide nicotinurique est remplacé, soit par le sel de l'acide pyridine-monocarboxylique dont il dérive, soit par l'acide *iso*nicotinurique ou le sel de l'acide dont il est issu.

Dans le tableau XVII sont groupés les résultats.

L'analyse de ce tableau montre d'importantes variations expérimentales qui rendent difficile l'interprétation. Toutefois, il apparaît nettement que les dérivés hétérocycliques, d'une manière générale, inhibent la pigmentogénèse. Les chiffres les plus faibles sont fournis par les dérivés de la série γ, pour les plus fortes concentrations en dérivés pyridiques.

TABLEAU XVI

PIGMENTATION DE *Ps. aeruginosa* SUR MILIEU CONTENANT DES QUANTITÉS VARIABLES DE GLYCOCOLLE ET EN PRÉSENCE OU NON D'ACIDE NICOTINURIQUE

	GLYCOCOLLE ..... / PRODUIT X	100 / 0	90 / 10	80 / 20	70 / 30	60 / 40	50 / 50	40 / 60	30 / 70	20 / 80	10 / 90	0 / 100
X = solution mère	Bactériofluorescéine ...	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++	+	0
	Pyocyanine mg/l	14,4	26,4	26,4	28,4	26,5	42,4	37,6	34,4	15,2	3,2	0
X = solution d'acide nicotinurique	Bactériofluorescéine ...	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	0
	Pyocyanine mg/l	14,8	19,6	16,4	14,8	22,8	15,2	12,8	14,4	10,8	1,2	0

3° *Discussion des résultats*

Un fait saillant ressort de cette série d'essais : l'impossibilité pour un germe microbien, quelqu'il soit, d'utiliser les dérivés pyridiques des aminoacides, dérivés dont la fonction amine est bloquée par le groupement acylé hétérocyclique.

On peut donc admettre que le catabolisme d'un acide aminé non modifié, qui s'accompagne de l'apparition progressive de nouvelles substances parmi lesquelles prédominent divers aminoacides, débute par un phénomène de désamination. On conçoit alors qu'un composé chimique dont la fonction amine n'est plus libre ne puisse être dégradé et que les germes se trouvant dans un milieu nutritif trop pauvre ne puissent se multiplier.

Les dégradations ne sont d'ailleurs possibles que si l'équipement enzymatique du germe comporte les diastases susceptibles de s'attaquer à l'aminoacide, c'est en particulier les acidaminodéhydrases qui libèrent dans le milieu de culture de l'ammoniaque. *B. subtilis* et *Sarcina* ne semblent pas comporter cet enzyme qui contribue en outre, par une action réversible, à la synthèse des nouvelles substances azotées à partir de l'azote de l'acide aminé initial alors sous la forme d'ion ammonium.

Il n'en est pas de même de *Salmonella typhi, Cloaca cloacae* et, comme l'avaient déjà montré Cesaire et coll., de *Ps. aeruginosa* et *S. paratyphi B.* L'aptitude de ces différents germes à transformer l'acide aminé et le glycocolle en particulier n'est d'ailleurs pas égale. Cet aminoacide permet en effet une culture très abondante du bacille pyocyanique et de *Cloaca* alors que le groupe des entérobactéries est beaucoup moins apte à se multiplier dans de tels milieux. Signalons à ce sujet l'influence bénéfique des sels de sodium des acides pyridine β- et γ-carboxyliques et au contraire le rôle bactéricide du dérivé α, sur le développement de *S. paratyphi B.*

TABLEAU XVII

BIOSYNTHÈSE DE LA PYOCYANINE PAR *Ps. aeruginosa* EN PRÉSENCE OU NON DE DÉRIVÉS PYRIDIQUES ET DE QUANTITÉS VARIABLES DE GLYCOCOLLE

La quantité de pyocyanine est exprimée en milligrammes par litre de culture.

GLYCOCOLLE	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
PRODUIT X	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
X = solution mère	12	22,8	25,2	27,2	27,2	31,2	28,8	29,8	18,8	3,6	0
X = acide nicotinurique	15,6	14,8	16,4	14,4	17,2	11,2	14,4	14,8	12	2,6	0
X = nicotate de sodium	18,8	11,2	13,6	19,2	23,6	16,8	14,8	14,8	7,2	2	0
X = acide isonicotinurique	14,8	16,8	15,2	15,6	13,2	17,2	11,2	12	9,2	0	0
X = isonicotate de sodium	21,2	19,2	13,2	17,2	12,4	9,6	10,8	10	9,6	0	0

La présence simultanée du glycocolle et du noyau hétérocyclique dans le milieu ne modifie en rien le développement de *Ps. aeruginosa.* Au contraire, la biogénèse de ses pigments et en particulier du noyau phénazinique semble quelque peu inhibée par les dérivés pyridiques du glycocolle et les sels des acides pyridine-carboxyliques dont ils dérivent : le mécanisme de la synthèse des pigments par *Ps. aeruginosa* étant encore à démontrer il est difficile de tirer des conclusions valables de ce fait.

CONCLUSIONS DU DEUXIÈME CHAPITRE

Le deuxième chapitre est consacré à l'action des azides dérivés des acides pyridine-monocarboxyliques sur les acides aminés, constituants fondamentaux des protéines.

Nous avons tout d'abord étudié, en mettant en œuvre une technique chromatographique, l'affinité des azides pour la fonction amine du glycocolle. La réactivité des azides dépend de la position du groupement fonctionnel par rapport à l'azote hétérocyclique. La vitesse de condensation des dérivés étudiés est donnée par la relation :

azide α > azide γ > azide β

La présence, dans le dérivé aminé, d'une fonction acide et dans le milieu réactionnel, des ions OH^-, est indispensable pour que la réaction s'effectue.

Après avoir indiqué la synthèse des N-*iso*nicotylaminoacides et de trois nouveaux dérivés de cette série, nous avons réalisé leur étude spectrale et chromatographique, ainsi que celles de substances hétérocycliques apparentées.

Nous avons enfin examiné le comportement de plusieurs N-*iso*nicotylaminoacides vis-à-vis de la pousse de différents germes microbiens. Plusieurs des dérivés hétérocycliques d'aminoacides examinés manifestent, vis-à-vis du B.C.G., une légere action mycobactériostatique, dont l'effet apparaît cependant faible à côté de celui de l'isoniazide; les propriétés biologiques sont en rapport avec la présence du noyau pyridique.

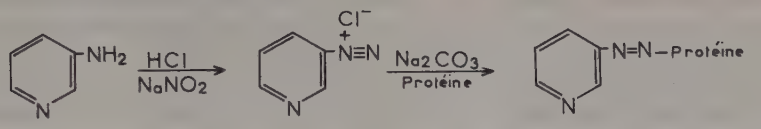
D'autres expériences ont été réalisées avec *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella paratyphi* B, *Bacillus subtilis, Salmonella typhi, Cloaca cloacae* et une sarcine ; ces différents germes sont incapables de transformer un acide aminé N-substitué par le radical pyridique en un acide aminé libre. Une étude plus détaillée a été effectuée avec *Ps. aeruginosa,* germe particulièrement facile à cultiver sur un milieu synthétique à base de glycocolle; seule la pigmentogénèse s'avère inhibée.

CHAPITRE III

ACTION DES AZIDES DES ACIDES PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUES SUR LES PROTÉINES

Nous avons déjà signalé plus haut (voir p. 12) les raisons qui nous ont amenée à introduire dans la molécule protéique des substituants de nature pyridique.

De telles modifications avaient déjà été réalisées à la suite des travaux de LANDSTEINER [113] sur les protéines substituées par diazotation. Ainsi ERLENMEYER et BERGER [65], NISONOFF et PRESSMAN [137] ont introduit dans la molécule de protéine le noyau de la pyridine à partir d'une amine pyridique. Cette substitution s'opère par diazotation selon le schéma réactionnel suivant :

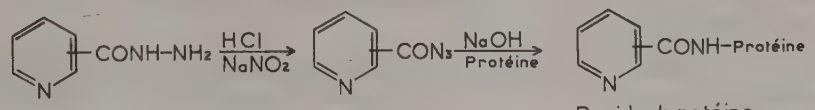


Pyridyl-3 azoprotéine

Nous désirions élargir le problème du comportement d'une protéine substituée par un noyau hétérocyclique en étudiant l'influence, sur les propriétés antigéniques de ces protéines, d'une part de l'isomérie, d'autre part de la fonction qui fait le lien entre la protéine et le noyau pyridique.

Nous inspirant des travaux de CLUTTON et coll. [38], qui fixent des groupements organiques (type : O-β-glucosidotyrosyle) sur des protéines par l'intermédiaire des azides, nous avons préparé des protéines substituées grâce aux azides des acides pyridine-monocarboxyliques.

Le schéma réactionnel général peut se résumer ainsi :



Pyridoylprotéine

Les investigations que nous avons conduites dans ce domaine seront exposées dans les deux sections de ce chapitre :

— préparation et propriétés des protéines substituées.

— quelques propriétés biologiques de ces protéines.

Ces investigations ont été effectuées principalement sur la sérum-albumine bovine dont la structure et les propriétés sont bien connues.

SECTION I

Préparation et propriétés des protéines substituées par des radicaux pyridiques

Nous examinerons dans la section I :

— la technique de préparation des protéines modifiées;

— le dosage des groupements pyridiques fixés;
— quelques propriétés physicochimiques des protéines modifiées.

Les données précédentes nous permettent de consacrer la fin de la première section de ce chapitre à l'étude du lieu de fixation des restants hétérocycliques.

I. — PRÉPARATION DES PROTÉINES SUBSTITUÉES

Nous avons suivi une technique voisine de celle initialement décrite par Clutton et coll. [38]. Cette technique s'est montrée valable pour les trois azides isomères.

A 1,5 ml d'une solution d'albumine bovine à 20 p. 100 (*) amenés au volume de 10 ml et à *p*H = 9,00 par addition de soude 0,1 N, on ajoute 2,5 ml de dioxanne (**). Le mélange ainsi réalisé est refroidi dans un bain de glace et agité pendant l'addition progressive de 2,5 ml de dioxanne, dans lesquels a été dissoute une quantité d'azide déterminée. Dans d'autres expériences nous avons utilisé une albumine humaine lyophilisée qui a été remise extemporanément en solution.

Le *p*H baissant au cours de la réaction, on le maintient au delà de 9,00 par des additions de NaOH 2 N (***). Lorsque le *p*H est stable la réaction est terminée.

Clutton pensait que l'addition d'azide devait se poursuivre pendant 15 minutes. En fait, dans nos conditions opératoires, ce temps peut être considérablement réduit, en particulier pour le dérivé α dont l'affinité pour la fonction amine des acides aminés est très grande (voir p. 38). Nous avons donc substitué, à un temps de contact déterminé d'une manière plus ou moins empirique, la stabilité du *p*H pour marquer la fin de la réaction azide-protéine. Nous pouvons nous assurer ainsi que l'excès d'azide est totalement hydrolysé, ce qui est important, comme nous le verrons ultérieurement, lorsque nous envisagerons les techniques de dosage des restes pyridiques fixés.

Le mélange est alors étendu d'eau distillée; il reste parfaitement limpide. Son acidification va entraîner la précipitation de la protéine modifiée; on ajuste le mélange à *p*H = 5,00 avec une solution d'acide acétique à 10 p. 100 et on l'amène à un volume final de 200 ml.

Après quelques heures de repos le précipité est recueilli par centrifugation, repris par la soude 0,01 N et remis en dissolution complète par l'adjonction de quelques gouttes de NaOH 0,1 N. La solution est dialysée contre de l'eau distillée pendant 18 heures. Au cours de la dialyse une légère opalescence apparaît lorsque le *p*H arrive au voisinage de la neutralité. Dans quelques expériences d'infimes particules se sont insolubilisées et ont été éliminées par filtration.

La solution est amenée à la concentration protéique de 1,5 g p. 100 et au *p*H désiré. Lorsqu'on veut conserver la protéine modifiée, la solution est dialysée contre NaCl à 0,3 p. 100 et lyophilisée.

Les protéines peuvent être également préparées par action directe de l'azide. Ce dernier, s'il est très soluble dans l'eau comme c'est le cas du dérivé α, est dissous au préalable dans 1 ou 2 ml d'eau. La réaction se fait naturellement en milieu alcalin et est suivie comme précédemment au *p*H mètre. Les protéines modifiées sont ensuite amenées à concentration désirée après dialyse de 24 heures.

Cette méthode de préparation sera utilisée dans des cas précis comme nous le verrons ultérieurement.

(*) Préparée par les laboratoires Povite, Amsterdam.
(**) Pour la précision des dosages ultérieurs il faut éviter que le mélange ne mousse lors de l'agitation. Nous avons remarqué que l'addition de dioxanne supprimait cet inconvénient.
(***) Le *p*H du milieu est suivi au Titriskop Metrohm.

II. — DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE GROUPEMENTS PYRIDIQUES FIXÉS SUR L'ALBUMINE BOVINE

Nous pouvons l'envisager sous deux angles :
— dosage à partir de la protéine elle-même;
— dosage de l'excès d'azide dans le surnageant après centrifugation et élimination de la protéine.

A. — DOSAGE A PARTIR DE LA PROTÉINE

Le principe du dosage consiste à mettre en évidence le noyau pyridique fixé par la réaction colorée de Konig [110] qui met en jeu le bromure de cyanogène. La réaction est spécifique de la pyridine et de tous les dérivés pyridiques mais, comme nous l'avons déjà vu, les dérivés α ne sont pas justifiables de cette réaction colorée. De ce fait seuls les groupements *iso*nicotylés et nicotylés peuvent être dosés par cette technique. Certains dérivés de la pyridine doivent subir une hydrolyse préalable pour donner une réaction colorée quantitative [55]. C'est le cas, entre autres, de l'amide et de la diéthylamide nicotique et de l'hydrazide *iso*nicotique. Nous l'avons également vérifié pour les *iso*nicotyl- et nicotyl-albumines bovines.

Ce dosage est donc basé sur la mise en liberté, par hydrolyse acide, du groupement hétérocyclique sous la forme d'acide correspondant et la détermination spectrophotométrique de la quantité d'acide formé, qui donne avec le bromure de cyanogène une coloration jaune dont le spectre d'absorption dans le visible montre une bande caractéristique. A cette longueur d'onde la densité optique suit la loi de Beer en fonction de la concentration.

Hydrolyse de la protéine

15 mg de protéine, soit 1 ml de la solution à 1,5 g p. 100, sont traités par 100 ml d'HCl 6 N pendant 20 heures à reflux. Le résidu est repris par 50 ml d'eau distillée, ajusté à pH = 7,00 avec de la soude et dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.

Réaction colorée [54] :

La réaction colorimétrique se pratique ainsi :

solution à étudier	5 ml
solution-tampon phosphate pH = 11,00	4 ml
solution aqueuse de BrCN à 5 g p. 100 (réalisée extemporanément)	1 ml

La solution tampon phosphate de pH = 11,00 est préparée par mélange de :

1 volume de NaOH 0,2 N
5 volumes de sol. de HNa_2PO_4, $2\,H_2O$ 0,2 M.

La coloration jaune, qui apparaît, n'atteint son complet développement qu'après un temps bien déterminé pour chaque isomère. Son intensité est alors mesurée à l'aide du spectrophotomètre Unicam SP 500, à la longueur d'onde déterminée pour son maximum qui varie suivant l'isomère considéré (cuves de 1 cm, température ambiante).

L'appareil est étalonné d'une part avec l'acide nicotique, d'autre part avec l'acide *iso*nicotique.

Dans nos conditions expérimentales nous trouvons que le maximum d'absorption de l'acide *iso*nicotique se situe à 425 mμ comme l'a montré Defranceschi [54] mais l'intensité maximale de coloration n'est obtenue qu'au bout de 45 minutes. La courbe standard de l'acide *iso*nicotique est donc établie à cette longueur d'onde avec des solutions aqueuses d'acide de concentrations croissantes : 2 μg, 4 μg, 8 μg, 10 μg au ml.

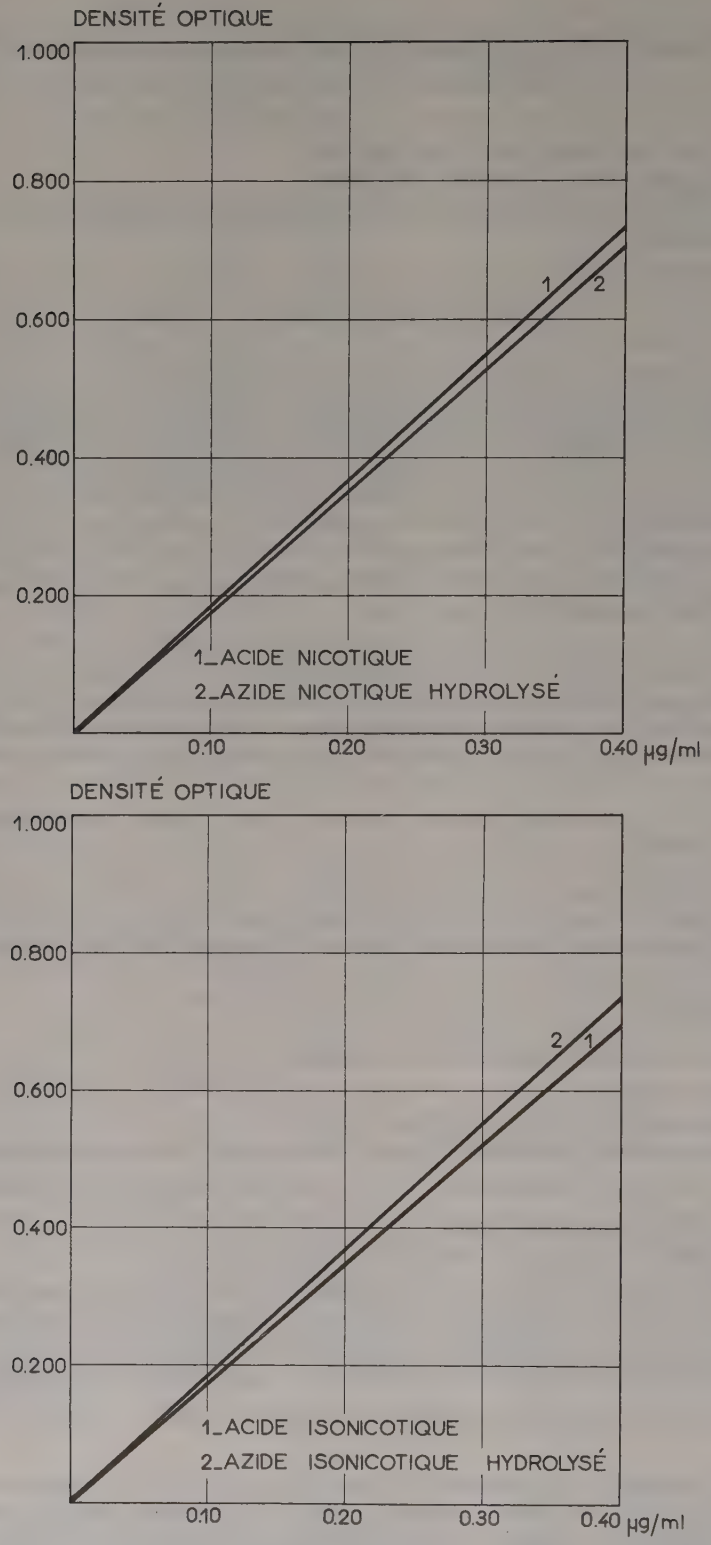


Figure 17

Réaction de König des acides nicotique et *isonicotique*. Variation de la densité optique au maximum d'absorption en fonction de la concentration en azote hétérocyclique.

Le spectre de l'acide nicotique présente lui aussi une bande d'absorption caractéristique. Nous avons identifié le maximum d'absorption à $\lambda = 404\ m\mu$. A cette longueur d'onde l'absorption suit la loi de Beer en fonction de la concentration; la lecture se fait après 20 minutes de contact pour permettre à la réaction colorée d'atteindre son complet développement. Sur la figure 17 nous avons représenté les courbes standards des acides nicotique et *iso*nicotique.

Résultats :

Nous avons étudié une gamme de protéines modifiées préparées par action de quantités croissantes d'azide sur une quantité fixe, soit 300 mg de sérum-albumine bovine dont le poids moléculaire est de 66.000.

Les tableaux XVIII, XIX groupent les résultats respectivement obtenus avec les *iso*nicotyl- et nicotyl-sérum-albumines bovines.

La quantité d'azide utilisée pour la modification de la protéine a été exprimée en poids réel et en mg d'azote hétérocyclique, 100 mg d'azide correspondant à 9,45 mg d'N hétérocyclique. Quant à la quantité de radicaux pyridiques fixés, nous l'avons indiquée en mg d'azote hétérocyclique et également en nombre de restes pyridiques par molécule de sérum-albumine. Pour connaître cette dernière valeur, il suffit de rapporter à la molécule la quantité d'N hétérocyclique fixé par 300 mg d'albumine et de diviser ce chiffre par le poids d'N hétérocyclique que contient un reste hétérocyclique, soit 14.

Comme on le voit, le nombre de restes hétérocycliques fixés sur une molécule de sérum-albumine bovine augmente en fonction de la quantité d'azide mis en jeu. Quelle que soit cette quantité, nous n'avons jamais pu observer une fixation supérieure à environ 80 groupements par molécule, chiffre qui paraît donc être une limite supérieure.

B. — DOSAGE DE L'EXCÈS D'AZIDE DANS LE SURNAGEANT

L'impossibilité de doser le groupement picolyl par la réaction de König à partir de la protéine nous a contraint à envisager un dosage spectrophotométrique en U.V. à partir du surnageant.

TABLEAU XVIII

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE *iso*NICOTIQUE SUR 300 MG D'ALBUMINE BOVINE

Azide mis en œuvre	en mg	60	70	100	131	148	740	1000
	en mg d'azote hétérocyclique	5,67	6,61	9,45	12,38	13,98	69,97	94,5
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg		2,5	2,4	2,8	3,2	4	5,3	5,2
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine ..		39	37	44	50	64	83	81

Lors de la préparation de la protéine modifiée nous opérons à un *p*H au moins égal à 9,00. Or, nous avons vu dans le premier chapitre de notre travail que, sous l'influence des ions OH^-, l'azide subit une hydrolyse qui le transforme en acide correspondant. Le surnageant contient donc, outre l'acide, des ions N_3^- qui n'ont aucune influence sur la longueur d'onde du maximum (fig. 4) dont l'intensité d'absorption varie en fonction de la concentration. Cette variation suit sensiblement la loi de Beer-Lambert, avec cependant quelques écarts dans les plus fortes concentrations dus vraisemblablement à la complexité du milieu.

TABLEAU XIX

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE NICOTIQUE SUR 300 MG D'ALBUMINE BOVINE

Azide mis en œuvre	en mg	45	60	70	80	120	148	1000
	en mg d'azote hétérocyclique	4,27	5,67	6,61	7,56	11,34	13,98	94,5
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg		2,24	2,5	2,4	2,6	3,5	4	5,1
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine ...		35	39	37	40	55	62	80

Le dosage de l'excès d'azide se ramène donc au titrage de son produit d'hydrolyse, l'acide correspondant, dans le surnageant. La détermination spectrophotométrique sera donc réalisée aux longueurs d'onde suivantes :

266 mμ pour l'acide *iso*nicotique
262 mμ pour l'acide nicotique
265 mμ pour l'acide picolique.

Les courbes standards ont été établies, à la température ambiante, aux longueurs d'onde précitées avec des solutions de concentration croissante et à $pH = 5{,}00$ (pH du surnageant après précipitation de la protéine) soit d'acides, soit d'azides hydrolysés. Nous avons utilisé le spectrophotomètre Unicam, équipé de cuves de quartz de 1 cm.

Les courbes sont construites en portant la densité optique en fonction de la concentration en N hétérocyclique par ml (figure 18).

Les différences de densité optique trouvées pour l'acide et son équivalent en azide hydrolysé sont très importantes. Pour 1 μg d'N hétérocyclique elles sont d'environ :

10 p. 100 pour le dérivé β
20 p. 100 pour le dérivé γ
30 p. 100 pour le dérivé α

L'impossibilité de purification des azides doit être vraisemblablement tenue pour responsable de cette différence considérable dans l'étalonnage.

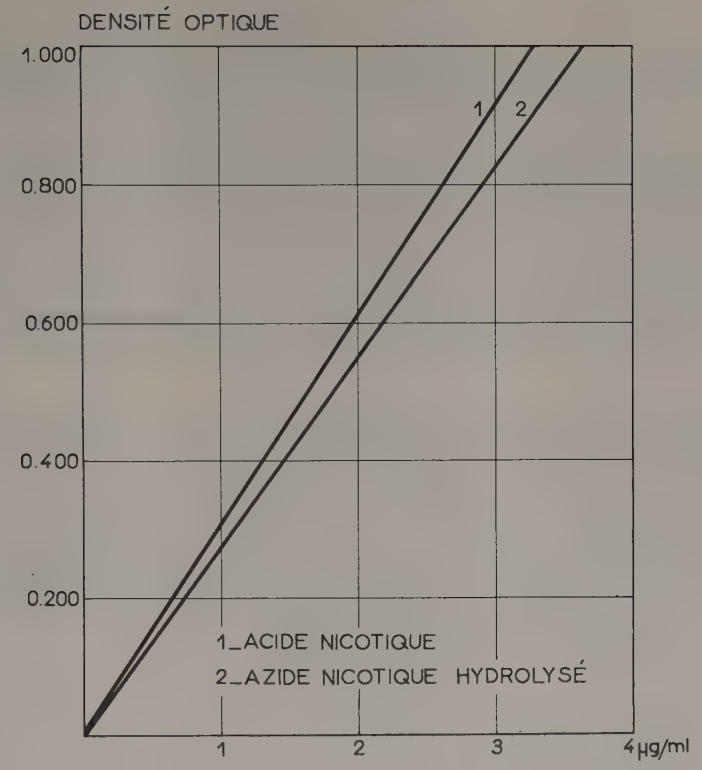
Pour pouvoir cependant interpréter d'une manière plus précise nos résultats expérimentaux nous avons réalisé, pour le dérivé β et γ, des dosages en retour à l'aide de la réaction de König dont nous avons décrit la technique (voir p. 59).

Le spectrophotomètre a également été étalonné avec l'azide hydrolysé. Les différences trouvées dans l'étalonnage par l'acide ou l'azide hydrolysé sont relativement faibles : 5 p. 100 pour le dérivé β (fig. 17), 8 p. 100 pour l'isomère γ (fig. 17), pour 0,10 μg d'N hétérocyclique.

Résultats :

Tous les calculs ont été faits à partir des courbes d'étalonnage par les azides hydrolysés.

Nous rapportons dans les tableaux XX, XXI et XXII les résultats obtenus par les méthodes en retour, soit la réaction de König pour les isomères β et γ, soit la spectrophotométrie en U.V. pour les trois azides. Nous empruntons également aux tableaux XVIII et XIX quelques chiffres trouvés par la méthode directe pour les dérivés β et γ



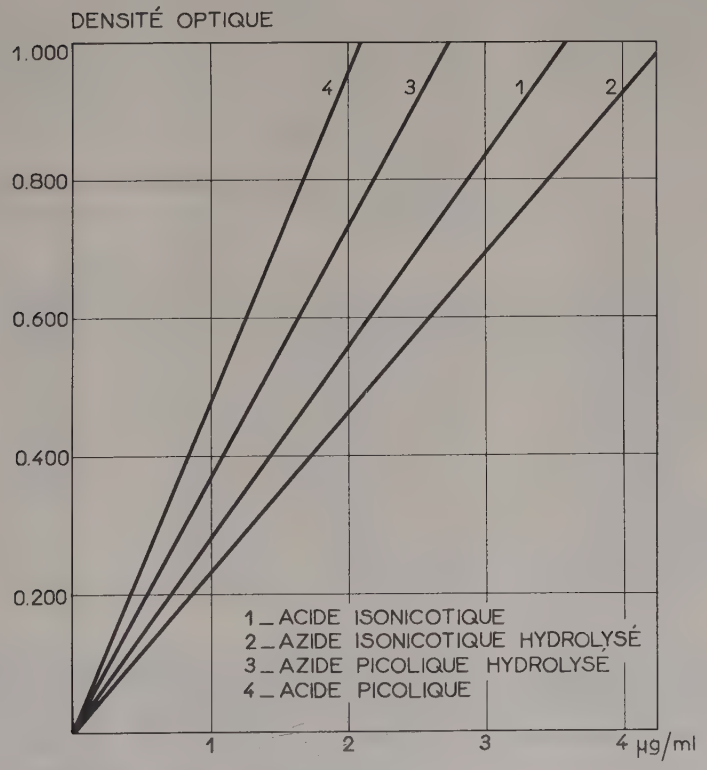


FIGURE 18

Détermination spectrophotométrique en U.V.
des acides pyridine-carboxyliques.

TABLEAU XX

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE PICOLIQUE SUR 300 MG D'ALBUMINE BOVINE (dosage en retour par spectrophotométrie en U.V.)

Azide mis en œuvre	en mg	30	60	70	100
	en mg d'azote hétérocyclique	2,83	5,67	6,61	9,45
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg		2,035	2,97	3,21	3,5
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine ..		31	46	50	55

TABLEAU XXI

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE NICOTIQUE SUR 300 MG D'ALBUMINE BOVINE

Azide mis en œuvre	en mg		70	80	120	148
	en mg d'azote hétérocyclique		6,61	7,56	11,34	13,98
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg	Dosage direct à partir de la protéine		2,5	2,4	3,2	4
	Dosage en retour à partir du surnageant	Par la réaction de König	2,61	2,61	5	4,58
		Par spectrophotométrie en U.V. .	2,75	3,08	4,46	4,23
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine bovine	Dosage direct à partir de la protéine		39	37	50	62
	Dosage en retour à partir du surnageant	Par la réaction de König	41	41	78	71
		Par spectrophotométrie en U.V. .	44	44	70	66

TABLEAU XXII

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE *iso*NICOTIQUE SUR 300 MG D'ALBUMINE BOVINE

Azide mis en œuvre	en mg		70	100	131	148
	en mg d'azote hétérocyclique		6,61	9,45	12,38	13,98
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg	Dosage direct à partir de la protéine		2,4	2,8	3,2	4
	Dosage en retour à partir du surnageant	Par la réaction de König	2,59	2,85	4,88	5,28
		Par spectrophotométrie en U.V. .	2,75	3,08	5,1	5,4
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine bovine	Dosage direct à partir de la protéine		37	44	50	64
	Dosage en retour à partir du surnageant	Par la réaction de König	40	44	76	82
		Par spectrophotométrie en U.V. .	43	48	80	84

L'examen des tableaux XX, XXI et XXII montre que les dosages en retour donnent des résultats plus élevés; quelle que soit la technique utilisée, ces différences sont plus marquées pour les fortes concentrations. Si en effet l'erreur relative entre la détermination d'un acide pyridique isolé ou obtenu par hydrolyse de son azide est la même dans toute la gamme des concentrations, l'erreur absolue au contraire augmente avec la concentration ; or l'expression du nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule de sérum-albumine correspond justement à une valeur absolue.

Le tableau ci-dessous nous en donne un bon exemple.

TABLEAU XXIII

DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE EN U.V.

Action de 1 000 mg d'azide nicotique, soit 94,5 mg d'N hétérocyclique, sur 300 mg d'albumine.
Dilution au 1/250e du surnageant.

Densité optique en mμ par ml	0,450	0,460
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg	9,5	12
Nombre de restes hétérocycliques par molécule d'albumine	149	198

De plus les dosages en retour présupposent un azide pur, ce dont nous ne sommes pas sûre. Les gros écarts trouvés en U.V. dans les courbes d'étalonnage de l'acide et de son azide hydrolysé correspondant sont en faveur de cette hypothèse.

S'il est donc préférable de s'en tenir aux résultats des dosages directs pour leur interprétation, ces dosages en retour, aussi imprécis soient-ils, nous ont cependant permis de comparer le dérivé α à ses isomères.

C. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Nous pouvons à présent tirer de nos essais les conclusions suivantes :

1°) Quel que soit l'isomère considéré, plus la quantité d'azide entrant en réaction avec la protéine est grande, plus cette dernière fixe de groupements pyridiques. Nous avons représenté sur la figure 19 la courbe du nombre de restes hétérocycliques (R) liés à une molécule d'albumine bovine en fonction du poids (P) d'azide mis en jeu. Il apparaît que la fixation s'effectue par paliers successifs et tend vers une limite que nous pouvons évaluer à 80 par molécule d'albumine bovine.

2°) Nous remarquons également que, de toutes les protéines substituées que nous avons analysées, aucune ne montre moins de 30 à 35 restes hétérocycliques. Ceci n'im-

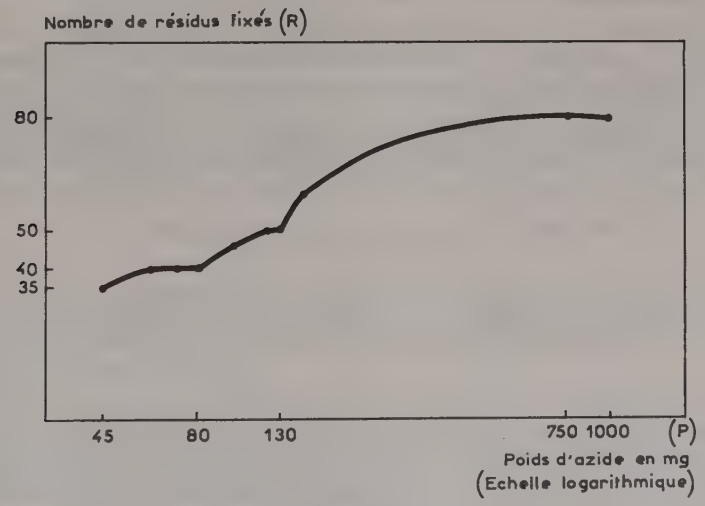


FIGURE 19

Action des azides pyridiques sur la sérum-albumine de bœuf.
Influence de la qualité d'azide mis en œuvre sur la substitution de la protéine.

plique pas l'impossibilité d'obtenir des protéines de substitution plus faible. Rappelons cependant que notre protéine modifiée est isolée grâce à sa faible solubilité en milieu acide, puisque nous terminons notre préparation en amenant le milieu à $pH = 5{,}00$ par l'acide acétique. On peut donc dire qu'il est nécessaire, pour que la sérum-albumine de bœuf subisse les modifications de solubilité, qu'elle possède au minimum les 30 à 35 restes hétérocycliques. Nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur les modifications physicochimiques des protéines traitées par les azides.

Si le minimum, soit 30 à 35 restes hétérocycliques fixés, est sensiblement identique pour les trois azides, la dose minimale d'azide qui permet de réaliser cette protéine est différente suivant les isomères et particulièrement pour le dérivé α. Nous avons essayé de déterminer la quantité minimale d'azide nécessaire pour obtenir, à partir de 300 mg d'albumine bovine, une protéine substituée qui précipite *totalement* par la solution d'acide acétique à 10 p. 100. Elle est de 30 mg pour le dérivé α contre 45 et 48 mg pour ses isomères β et γ.

Cette dose minimale est impérative. A 1 ou 2 mg près nous n'obtenons qu'un surnageant trouble et qui ne précipitera plus malgré l'addition d'acide acétique à 10 p. 100. Par contre une vérification par le réactif de Tanret montre qu'il contient encore de l'albumine. Cette albumine n'est plus de l'albumine native, elle a déjà subi une modification. En effet, après concentration du surnageant par ultra-filtration, nous en avons pratiqué une électrophorèse. Elle migre plus vite que la protéine normale, particularité que nous décrirons plus longuement (voir p. 75).

Si l'on considère la quantité d'N hétérocyclique que représente cette quantité minimale soit 2,83 mg pour le dérivé α, 4,27 mg pour le dérivé β, 4,53 mg pour le dérivé γ, elle est relativement élevée en regard de la quantité d'N hétérocyclique fixé et particulièrement dans le cas des isomères β et γ, soit 2 mg pour l'azide picolique, 2,24 mg pour les azides *iso-* et nicotique.

Ce que nous savons des propriétés physicochimiques des azides pyridine-carboxyliques nous permet de donner une explication à cette remarque. En effet deux facteurs interviennent dans la détermination de la quantité minimale d'azide permettant l'obtention d'une protéine suffisamment modifiée pour qu'elle puisse précipiter totalement à $pH = 5{,}00$:

— la vitesse d'hydrolyse de l'azide;

— L'affinité de l'azide pour la protéine et en particulier pour la fonction amine des acides aminés.

On conçoit aisément que l'azide picolique dont la vitesse d'hydrolyse est inférieure à celle du dérivé γ, mais dont la vitesse de condensation avec la fonction amine est beaucoup plus élevée, nécessite une quantité minimale moindre.

Le dérivé β, qui réagit cependant plus lentement avec la protéine que l'azide *iso*nicotique, a en regard une vitesse d'hydrolyse tellement plus faible qu'il n'est pas anormal de trouver une quantité minimale légèrement inférieure à celle de son isomère γ.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DES PYRIDOYLALBUMINES BOVINES

Les propriétés physiques des protéines sont en relation très étroite avec leur structure. Nous rappellerons donc, avant d'entreprendre l'étude des propriétés physicochimiques des pyridoylalbumines bovines, la composition en acides aminés de l'albumine bovine que nous empruntons à Edsall [62]. La composition en aminoacides de la sérum-albumine bovine, protéine de poids moléculaire voisin de 66.000, sera donnée par le nombre de résidus par molécule d'albumine.

Résidus non polaires ou faiblement polaires :

	glycocolle	16
	alanine	46
	valine	33
	leucine	62
	*iso*leucine	13
	proline	27
	phénylalanine	23
	tryptophanne	2
	méthionine	4
acides aminés hydroxylés	sérine	27
	thréonine	28
	tyrosine	18
acides aminés soufrés	cystéine (— SH)	1
	cystine (Cy — S — S — Cy)	17

Résidus chargés et amidés :

arginine	22
histidine	17
lysine	57
acide aspartique	62
acide glutamique	75
NH_3 (groupes amidés)	37

Données globales :

charges positives totales	97
charges négatives totales	101

Les charges positives totales comportent l'histidine, l'arginine, la lysine et un groupe α-aminé terminal qui appartient à l'acide aspartique.

Les charges négatives totales groupent l'acide aspartique, l'acide glutamique et un groupe α-carboxylique terminal qui a été identifié à la fonction carboxylique de l'alanine; on retranche de l'ensemble les groupes amidés.

Nous envisagerons successivement :

— le spectre d'absorption dans l'ultra-violet;
— la solubilité en présence de sulfate d'ammonium;
— la solubilité en fonction du *p*H;
— la mobilité électrophorétique.

D'une manière générale, nous avons étudié le comportement des albumines modifiées comportant le minimum et le maximum de restes hétérocycliques fixés, soit respectivement 35 et 80 pour chaque protéine traitée par un azide isomère.

A. — SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

La plupart des protéines, parmi lesquelles l'albumine bovine, absorbent l'ultra-violet au voisinage de 280 mμ, absorption due aux aminoacides cycliques, tryptophanne et phénylalanine notamment [103].

L'introduction du noyau pyridique dans la molécule d'albumine bovine modifie totalement l'absorption spectrale de cette dernière. Le maximum à 280 mμ s'efface quelque soit l'isomère pyridique introduit; il apparaît un maximum particulièrement marqué dans le cas des picolyl- et nicotyl-albumines bovines. Ces maximums, situés respectivement à 265 mμ et 262 mμ, coïncident avec le maximum de l'acide correspondant.

Les spectres ont été réalisés aux *p*H = 2,50, 6,90 et 9,50. Le blanc est constitué, selon les cas, soit par de l'eau distillée, soit par une solution d'albumine bovine de *p*H et de

concentration identique à la solution étudiée ($7{,}5 \times 10^{-3}$ g p. 100) de façon à éliminer l'absorption due à l'albumine bovine.

Nous avons reporté sur la figure 20 les spectres d'absorption d'une nicotylalbumine bovine dans laquelle ont été introduits 35 restes hétérocycliques. L'examen de ces graphiques montre que le *p*H ne modifie que légèrement le tracé du spectre : seule change l'intensité d'absorption, comme c'est le cas d'ailleurs de l'acide correspondant dont le maximum est extrêmement sensible aux moindres variations de *p*H.

Il faut noter cependant l'apparition d'une petite bande dont le maximum est à 240 mμ sur le spectre de la protéine à $p\text{H} = 6{,}90$, lorsque la lecture est effectuée avec l'albumine bovine à même concentration et même *p*H comme blanc.

La protéine traitée par l'azide picolique (fig. 21) se comporte d'une manière tout à fait analogue; seule la densité optique du maximum d'absorption est influencée par le *p*H ; tout au plus peut-on remarquer un léger déplacement hypsochrome du maximum à $p\text{H} = 9{,}50$; mais l'allure générale du spectre reste la même et l'on retrouve également à $p\text{H} = 6{,}90$ (courbe différentielle 2) la bande d'absorption de maximum $\lambda = 240$ mμ signalée ci-dessus.

L'*iso*nicotylprotéine au contraire manifeste un comportement différent. Pour aucune des valeurs de *p*H examinées on ne retrouve le maximum obtenu avec les isomères α et β.

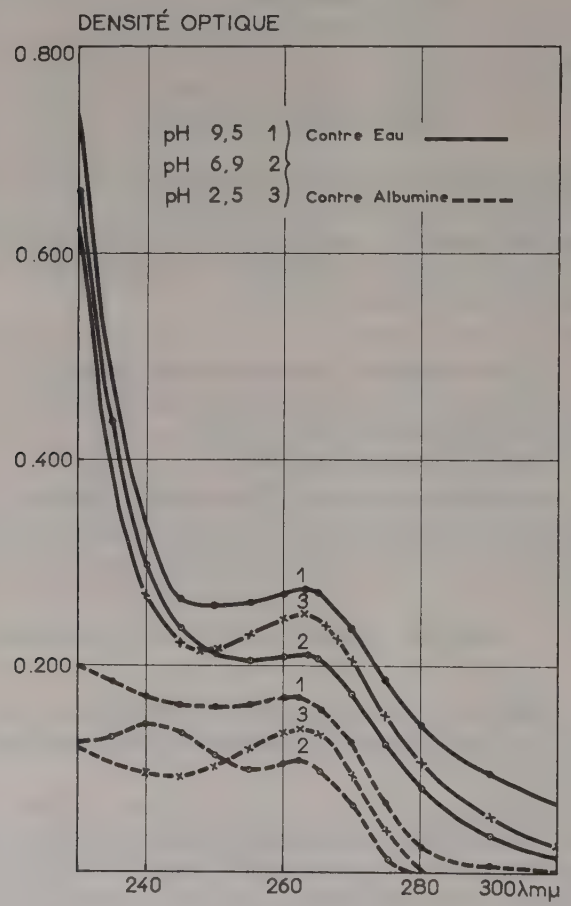


FIGURE 20

Spectres d'absorption d'une N-nicotylalbumine bovine.
Influence du *p*H.

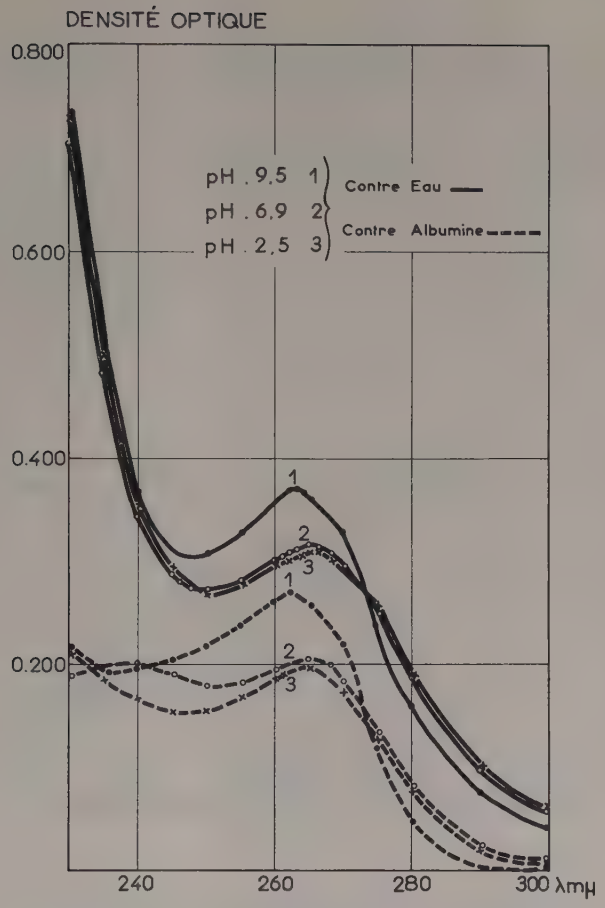


FIGURE 21

Spectres d'absorption d'une N-picolylalbumine bovine.
Influence du pH.

Les courbes présentent simplement un épaulement entre 265 et 250 mμ. Nous représentons sur la figure 22 les courbes à $pH = 6{,}90$. Le maximum spécifique du groupement γ (maximum 266 mμ) n'apparaît pas non plus lorsqu'on élimine l'absorption propre à l'albumine native mais là encore nous retrouvons le maximum à 240 mμ.

L'allure des spectres de ces albumines rappelle d'une manière générale celle des acides aminés dans la molécule desquels nous avons introduit un groupement pyridique (voir p. 45).

La fixation de 80 restes hétérocycliques ne modifie en rien le tracé général des spectres, quelque soit la protéine isomère envisagée. Par contre l'absorption enregistre nettement l'augmentation du nombre de noyaux, ce qui se traduit par une élévation très sensible de la densité optique des maximums spécifiques.

APPLICATION : **dosage du nombre de résidus fixés.**

Ce dosage ne peut s'appliquer qu'aux nicotyl- et picolyl-albumines bovines dont les spectres présentent un maximum, respectivement à 262 mμ et 265 mμ. Pour supprimer toute variation possible du pH, les dosages sont pratiqués à partir de protéines diluées par un tampon (concentration finale : $7{,}5 \times 10^{-3}$ g p. 100). L'étude est faite à $pH = 6{,}90$ en tampon phosphate de Sörensen.

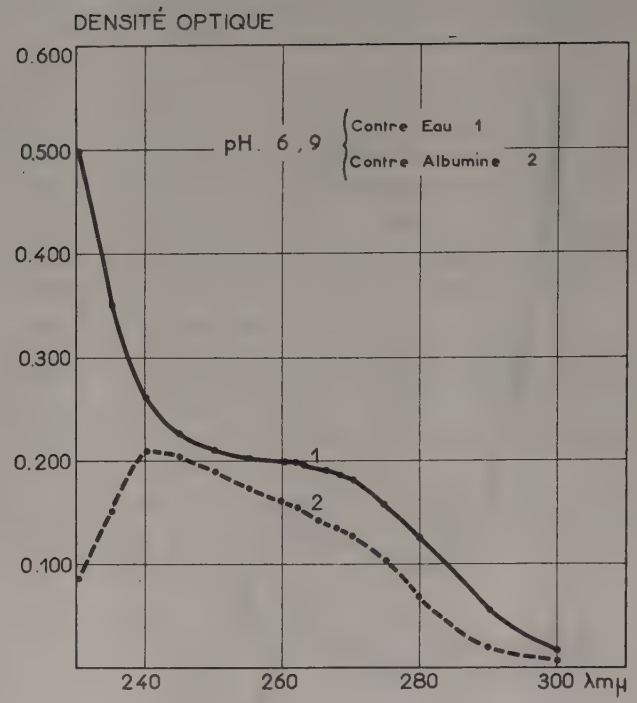


FIGURE 22

Spectres d'absorption d'une N-*iso*nicotylprotéine à *p*H = 6,90

Les lectures sont réalisées avec, comme blanc, une albumine bovine native dans les mêmes conditions de concentration et de *p*H; le spectrophotomètre Unicam SP 500 est étalonné au moyen de solutions des acides correspondants dans le même tampon. Les courbes d'étalonnage, construites en portant la densité optique en fonction de la concentration en N hétérocyclique par ml, se sont montrées parfaitement linéaires.

Les résultats des dosages des groupements pyridiques fixés sont réunis dans le tableau XXIV. Dans l'ensemble ils concordent avec ceux que nous donnent les techniques précédemment décrites.

B. — SOLUBILITÉ EN PRÉSENCE DE SULFATE D'AMMONIUM

Les substances organiques doivent leur solubilité dans l'eau aux groupes polaires présentant une forte attraction pour les dipôles de l'eau. La solubilité de l'albumine bovine sera donc principalement conditionnée par la répartition et la proportion respective de ses groupes polaires hydrophiles et apolaires hydrophobes de ses acides aminés constitutifs.

Si l'on ajoute du sulfate d'ammonium dont les ions SO_4^{--} sont fortement chargés, ces derniers tendent à capter les molécules d'eau. Quand la concentration en sel est suffisamment élevée, ce phénomène devient prépondérant. Il y a compétition entre les anions et les groupes polaires pour fixer les molécules d'eau et, par suite, diminution des possibilités de formation de liaisons hydrogène entre l'eau et l'albumine. La quantité de sel à ajouter pour obtenir la précipitation est fonction du *p*H d'une part et de la concentration en albumine d'autre part.

TABLEAU XXIV

DOSAGE DU NOMBRE DE RESTANTS PYRIDIQUES FIXÉS SUR L'ALBUMINE BOVINE

Azide mis en œuvre		NICOTYLALBUMINE BOVINE				PICOLYLALBUMINE BOVINE			
	en mg (*)	45	60	100	500	36	60	70	1000
	en mg d'azote hétérocyclique	4,27	5,67	9,45	47,25	3,39	5,67	6,61	94,5
Quantité d'N hétérocyclique fixé, exprimée en mg		2,3	2,6	3,3	5,6	2,4	3	3,2	5,4
Nombre de restes hétérocycliques fixés par molécule d'albumine bovine		36	40	51	87	37	47	50	84

(*) Nous entendons par là le poids d'azide ayant agi sur 300 mg d'albumine bovine.

Ainsi la sérum-albumine à pH = 7,00 et à la concentration de 0,04 p. 100 précipite à un degré de saturation en sulfate d'ammonium de 70 à 78 p. 100 [103].

Nous avons fait agir sur des solutions de pyridoylalbumine bovine, à la concentration de 1,5 g p. 100 et de pH = 7,00, une solution saturée de sulfate d'ammonium. Les protéines modifiées par les trois azides isomères se comportent d'une manière pratiquement identique : la quantité de sel nécessaire pour obtenir leur précipitation varie en fonction du nombre de noyaux hétérocycliques fixés.

La figure 23 donne les courbes de précipitation d'une *iso*nicotyl-albumine bovine à 35 (courbe 1) et 80 restes hétérocycliques fixés (courbe 2).

Ainsi l'*iso*nicotyl-albumine bovine qui contient 35 restes précipite à un degré de saturation de 45 p. 100 contre 30 p. 100 pour la même albumine bovine contenant 80 restes. Dans les mêmes conditions de concentration et de pH, l'albumine bovine non modifiée n'est pas totalement précipitée à un degré de saturation de 83 p. 100.

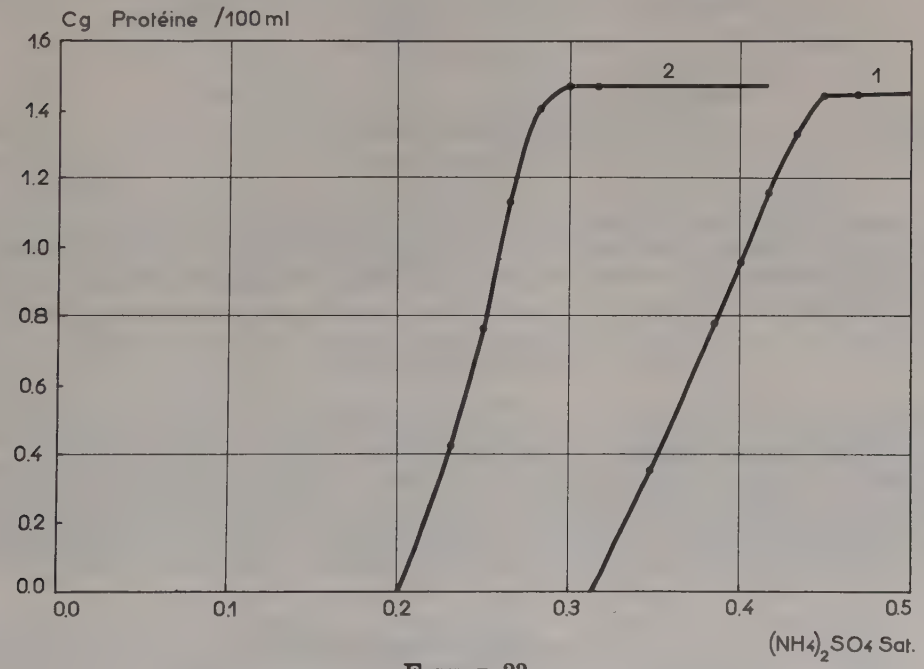


FIGURE 23

Courbes de précipitation de deux nicotylalbumines bovines.
Influence de la substitution.
1 = 35 restes/mol.
2 = 80 restes/mol.

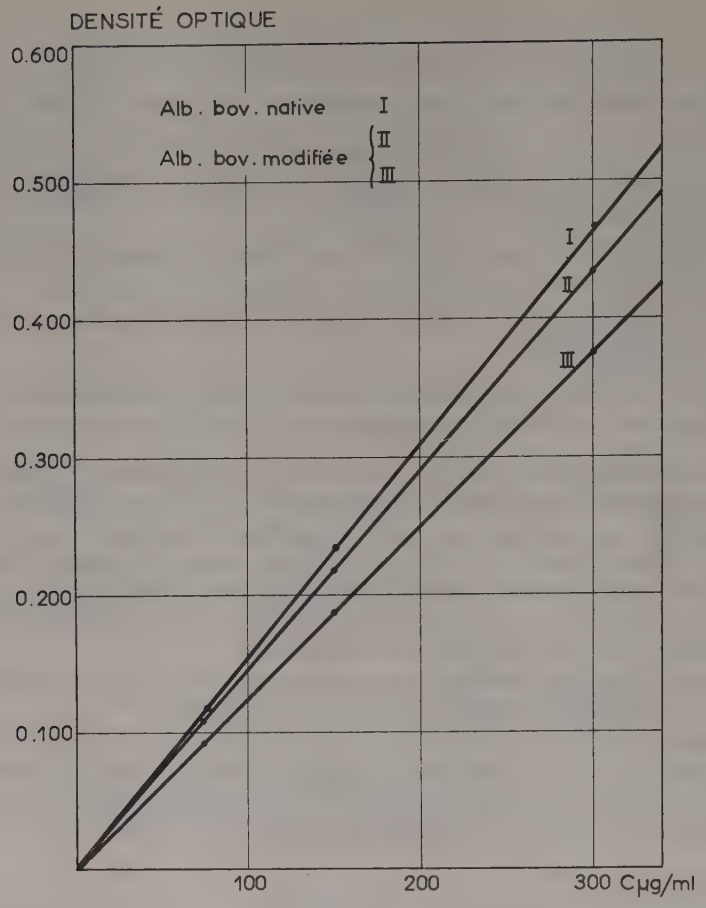


FIGURE 24

Dosage d'une sérum-albumine native (I) et de cette protéine modifiée par la méthode de Folin-Ciocalteu.
II = 35 restes/molécule
III = 80 restes/molécule

Il faut en conclure que le nombre de groupes chargés de la protéine a fortement diminué et cela d'autant plus que la protéine fixe plus de restes hétérocycliques. Ceci permet déjà d'orienter les recherches quant à l'emplacement possible du groupement pyridique sur la protéine.

Partie expérimentale

La précipitation est réalisée, en tubes à centrifuger coniques tarés, par action d'une solution saturée de sulfate d'ammonium et neutralisée à pH = 7,00. On opère à volume constant avec des quantités fixes d'albumine et des quantités croissantes de sulfate d'ammonium.

On centrifuge à 4 000 g pendant dix minutes. Le surnageant est décanté et le culot de centrifugation dissout dans une quantité d'eau correspondant au volume initial. La protéine est à nouveau précipitée dans les mêmes conditions de concentration saline. Après une nouvelle centrifugation et décantation, le précipité est traité par l'alcool à 90° au B.M. bouillant pendant 10 minutes, puis, après élimination de l'alcool, il subit deux lavages à l'eau distillée et est mis au dessicateur, puis finalement pesé.

C. — SOLUBILITÉ EN FONCTION DU pH

Nous avons choisi, pour établir la courbe de solubilité en fonction du pH des protéines modifiées, une solution d'acétate de sodium de force ionique 0,03 dans laquelle a été dissoute la protéine examinée, à la concentration de 300 μg/ml. La protéine est préci-

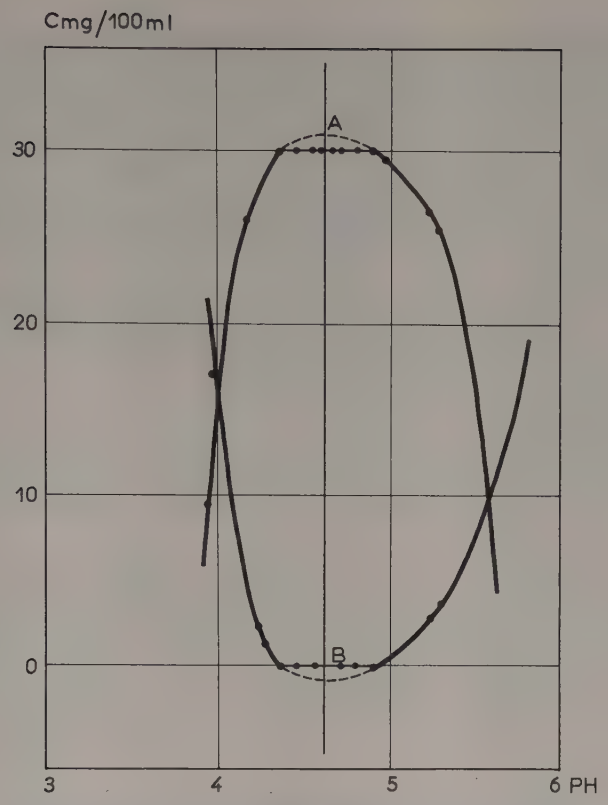


FIGURE 25

Influence du *p*H sur la solubilité d'une *iso*nicotyl-sérum-albumine (30 restes pyridiques)
A = courbe de précipitation
B = courbe de solubilité.

pitée de cette solution par addition de quantités croissantes d'HCl 0,1 N. Nous opérons sur un volume initial de 15 ml. La protéine est séparée par centrifugation à 24 000 g, à la température de 5° C, opération réalisée dans une centrifugeuse réfrigérée.

La méthode de Folin-Ciocalteu modifiée par LOWRY et coll. [116], basée sur la mise en évidence des groupements phénoliques, nous permet de doser, d'une part la quantité de protéine précipitée après redissolution dans un tampon véronal de *p*H = 8,60 (15 ml), d'autre part la protéine restant dans le surnageant. Le spectrophotomètre est au préalable étalonné par la même technique avec des albumines comportant 30 et 80 restes hétérocycliques (lecture en cuves de 0,5 cm d'épaisseur).

La réaction de Folin se pratique comme suit :

On met dans un tube à essais : 1 ml de solution de protéine auquel on ajoute 5 ml d'une solution cuprique alcaline (*). On mélange et on attend 10 minutes avant de verser 0,5 ml de réactif de Folin N (**). On agite et on effectue la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 750 mμ après 30 minutes. Un blanc est fait selon la même technique en remplaçant la solution de protéine par du sérum physiologique.

(*) Préparée au moment de l'emploi en ajoutant 50 ml d'une solution de carbonate de sodium dans de la soude (réactif 1) à 1 ml de solution cuprique (réactif 2).

Réactif 1 :	Na_2CO_3	2 g	*Réactif 2 :*	$CuSO_4, 5H_2O$	0,5 g
	NaOH 0,1 N	100 ml		sel de seignette	1 g
				eau	100 ml

(**) Le réactif de Folin est amené par dilution au moment de l'emploi à une acidité normale. Il faut donc au préalable le titrer par une solution N de NaOH en présence de phénolphtaléine.

Nous avons constaté que l'introduction de restes pyridiques sur une sérum-albumine modifie légèrement son comportement vis-à-vis du réactif de Folin-Ciocalteu et que le degré de substitution doit être pris en considération. C'est la raison pour laquelle nous donnons dans la figure 24 un exemple des courbes d'étalonnage obtenues.

Notons en outre que la nature de l'isomère pyridique substituant ne joue aucun rôle dans ce dosage.

Nous avons pu constater ainsi la diminution très marquée de la solubilité des protéines modifiées en milieu légèrement acide. Ceci est particulièrement visible sur les courbes de la figure 25.

Après introduction de 35 restes d'acide *iso*nicotique, la solubilité de la sérum-albumine bovine s'annule complètement dès la valeur de pH = 4,90; une acidification plus importante du milieu ramène la protéine en solution à partir de pH = 4,30. *A* pH = 4,00 la protéine est de nouveau bien soluble.

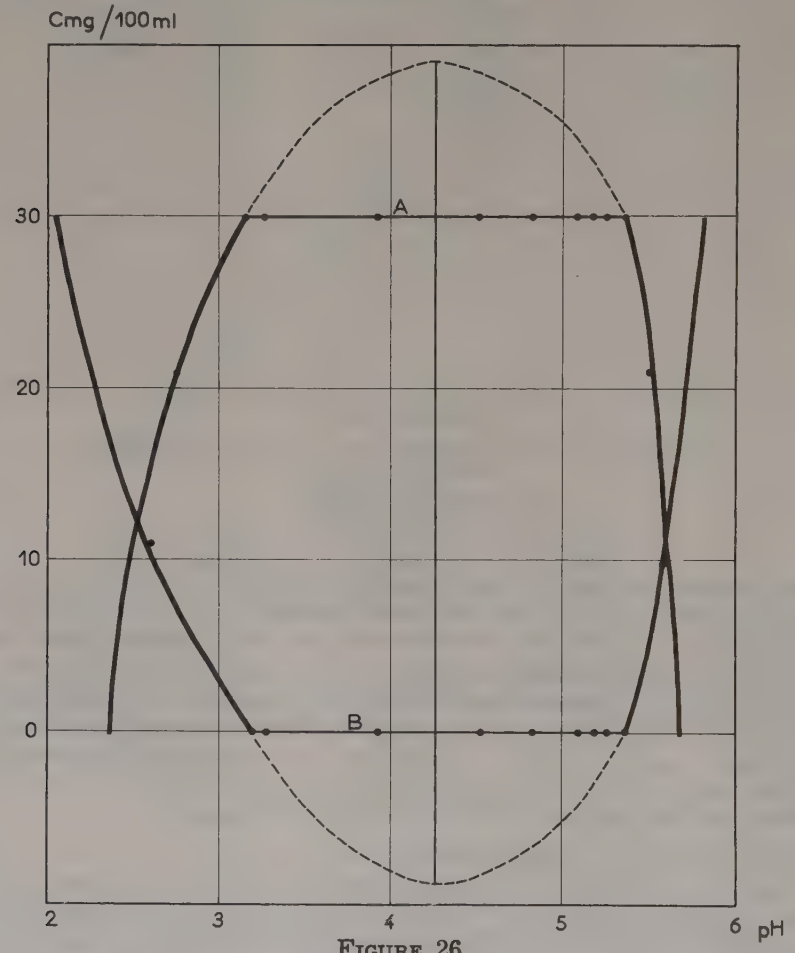


FIGURE 26

Influence du pH sur la solubilité d'une *iso*nicotyl-sérum-albumine
(80 restes pyridiques)
A = courbe de précipitation
B = courbe de solubilité.

Le tracé est analogue avec une protéine de même degré de substitution, mais dans laquelle le restant pyridique est de nature nicotique ou picolique. Au contraire l'introduction de nouveaux groupements hétérocycliques modifie considérablement les tracés (figure 26). La zone de pH où la protéine est insoluble est d'autant plus étendue que la protéine comporte un plus grand nombre de noyaux pyridiques dans sa molécule.

La solubilité d'une protéine présentant un minimum au voisinage de son point isoélectrique, nous pouvons situer le pH_i de l'albumine contenant 30 restes hétérocycliques aux environs de 4,62 et celui de la protéine la plus modifiée vers 4,25.

Nous pouvons comparer nos protéines substituées à l'albumine native : celle-ci a un pH_i de 4,7, mais il a été mesuré en solution de force ionique 0,1 [103]. Comme le point isoélectrique se déplace vers les zones acides lorsque la force ionique augmente, nous pouvons en conclure que les protéines modifiées qui, pour des solutions de force ionique moindre, présentent un déplacement de leur pH_i vers la zone plus acide, témoignent donc d'un abaissement très net de ce point isoélectrique et cela d'autant plus que la protéine a fixé un nombre de groupements plus élevé.

D. — MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE

Placée dans un champ électrique l'albumine se déplace vers la cathode en milieu acide et en milieu alcalin vers l'anode. La mobilité dépend, non seulement de la charge nette de la molécule protéique, mais aussi de la force ionique des solutions. Ainsi dans un tampon véronal de $pH = 8,60$ et de force ionique 0,1, est-elle de — 6,0 unités Tiselius [103].

Ne cherchant pas une mesure exacte de la mobilité de nos protéines mais simplement un terme de comparaison avec l'albumine native, nous avons utilisé la technique de micro-électrophorèse en gel de gélose (*). Comme le montre la figure 27, les pyridoylprotéines en tampon véronal de $pH = 8,60$ et de force ionique 0,033 témoignent d'une augmentation très nette de la mobilité. Ceci indique, ou une augmentation des groupements chargés négativement, ou une diminution des groupements chargés positivement. Cette dernière éventualité paraît la seule à retenir. Ceci est bien en accord avec l'abaissement observé du pH_i.

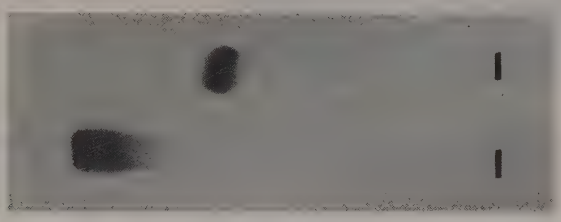


FIGURE 27

Electrophorèse de la sérum-albumine bovine native (en haut)
et de cette protéine après traitement par l'azide isonicotique (en bas).
Temps de migration : 20 minutes

Nous avons réalisé en outre une nouvelle expérience dans laquelle nous avons examiné l'influence du traitement par des quantités croissantes d'azide *iso*nicotique sur la mobilité électrophorétique de la sérum-albumine bovine. Ces protéines modifiées ont été préparées par action directe de dilutions de plus en plus grandes d'une solution d'azide dans le dioxanne, sans précipitation par l'acide acétique ni dialyse. La concentration finale est de 1,50 g p. 100.

Les résultats sont donnés sur la figure 28. En raison du nombre des essais l'expérience a été réalisée en deux temps, ce qui explique les légères différences des valeurs absolues de migration.

Le traitement par l'azide entraîne une augmentation progressive de la mobilité électrophorétique; cette augmentation reste assez faible tant que la quantité d'azide mis en œuvre ne dépasse pas 25 mg. Pour la valeur de 50 mg, donc correspondant sensiblement au minimum d'azide nécessaire pour réaliser la précipitation totale des 300 mg d'albumine à $pH = 5,00$, la mobilité électrophorétique atteint sa valeur limite. Des doses

(*) Pour les détails techniques, voir [119].

d'azide supérieures entraînent la disparition du caractère homogène de la protéine traitée. On peut identifier deux, puis trois et même peut-être quatre fractions de mobilité différente.

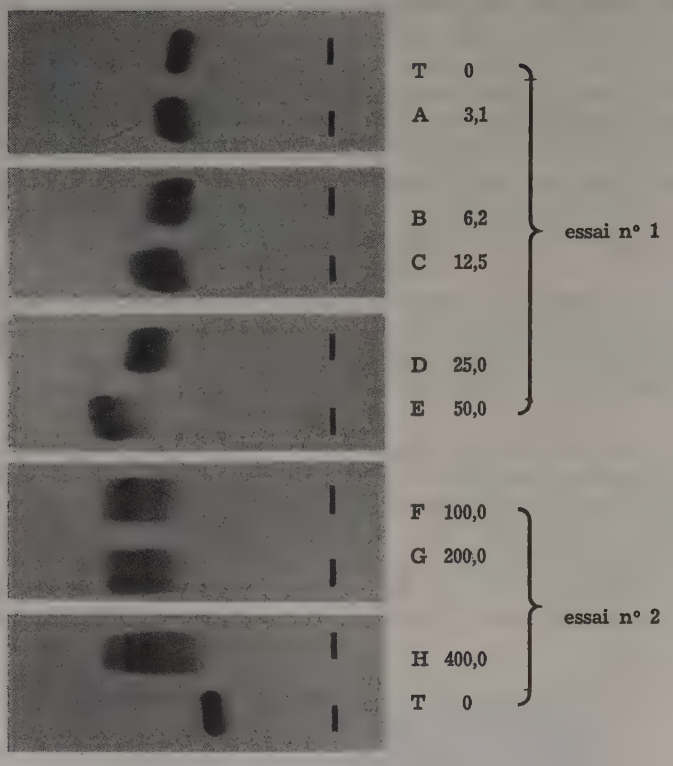


FIGURE 28

Electrophorèse de la sérum-albumine native (T) et de cette protéine traitée par différentes quantités d'azide isonicotique.
(les chiffres indiqués correspondent au nombre de mg d'azide mis au contact de 300 mg d'albumine).

Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus précédemment par le dosage des groupements pyridiques dans la molécule de protéine (voir p. 65). La substitution semble donc se faire par « paliers » progressifs, chacun d'eux correspondant vraisemblablement à la modification d'une fonction chimique particulière ou à la substitution d'une même fonction en différents endroits de la molécule.

IV. — LIEUX DE FIXATION DES RADICAUX PYRIDIQUES

Nous avons déjà insisté sur le fait que la sérum-albumine constitue une molécule dont la surface se trouve hérissée de toute une série de groupements chimiques différents (voir p. 35). De très nombreux réactifs chimiques (*), comme par exemple le formol [134, 135], le cétène [161], l'iode [148], le sulfure de carbone [7] se combinent avec les protéines. Il est donc important de connaître quels sont ceux qui ont effectivement réagi avec les azides pyridiques. On peut penser que ces groupements sont constitués par :

— des groupements basiques, et tout particulièrement des groupements aminés;
— d'autres groupements à hydrogène mobile, groupements phénoliques et thiols. Parmi ceux-ci, le groupement — SH, *a priori* très réactif, apparaît d'importance

(*) Pour une revue détaillée des modifications chimiques apportées aux protéines, voir [94].

secondaire dans le cas particulier de la sérum-albumine bovine qui en est très pauvre.

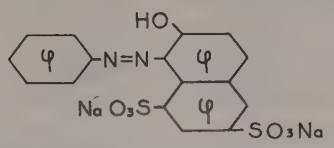
La participation des groupements aminés nous est imposée par les résultats exposés plus haut : affinité des azides pour le groupement $-NH_2$ des aminoacides, modification de la mobilité électrophorétique; rappelons enfin que le nombre maximum de groupements introduits dans la molécule d'albumine bovine (soit 80) correspond sensiblement à celui des fonctions chargées positivement (soit 97). Il nous a donc paru nécessaire de doser les fonctions acides libres ; nous avons en effet signalé précédemment que la réaction de Folin, qui met en jeu les groupements phénoliques, donne des résultats différents suivant que l'on s'adresse à une albumine bovine native ou à des albumines modifiées (voir p. 74).

La participation des groupements aminés a été confirmée par l'étude de l'action de l'azide *iso*nicotique sur une sérum-albumine de bœuf désaminée et enfin par l'identification, après hydrolyse, des aminoacides ayant réagi avec l'azide.

A. — DOSAGE DES FONCTIONS BASIQUES ET ACIDES

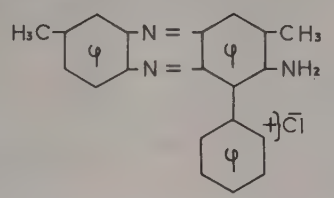
Le dosage des groupements basiques et acides totaux est réalisé par la technique de Fraenkel-Conrat et Cooper [73] basée sur la propriété, que possèdent ces groupements, de pouvoir se combiner avec certains colorants pour donner des complexes insolubles. Il suffit alors de doser spectrophotométriquement le colorant non combiné dans une solution protéique où celui-ci a été introduit en excès.

Le colorant utilisé pour le dosage des groupements basiques, à $p\mathrm{H} = 2{,}20$, est l'orange G [42] :



Orange G ou C.I. Acid orange 10
(wool orange 2 G.)

Pour le dosage des groupements acides à $p\mathrm{H} = 11{,}50$, on emploie la safranine O [42] :



Safranine O ou C.I. Basic Red 2
(Safranine T)

Les spectres de ces colorants montrent un maximum dans le visible à 482 mμ pour l'orange G et à 518 mμ pour la safranine O [43]. Des courbes standards, réalisées à ces maximums de longueur d'onde, vérifient la loi de Beer et permettent d'effectuer des dosages dans les surnageants. Le colorant lié à la protéine est déterminé en soustrayant l'excès trouvé dans le surnageant de la quantité de colorant ajouté. La valeur moyenne de la quantité fixée, exprimée en mg et multipliée par un facteur de conversion, donne le résultat en terme d'équivalents de colorant lié par gramme de protéine $\times\ 10^4$.

Le facteur de conversion est de 5,62 pour les équivalents basiques et de 8,85 pour les équivalents acides.

Les résultats d'une des nombreuses expériences effectuées sont groupés dans le tableau XXV.

Examinons tout d'abord le cas des groupements basiques. Remarquons tout d'abord la validité de notre méthode en ce qui concerne la sérum-albumine bovine native. Pour cette protéine modifiée, il existe une certaine discordance entre les chiffres « théoriques » (déduits de nos dosages antérieurs) et ceux trouvés par la méthode de Fraenkel-Conrat. Nous pouvons penser que les protéines β et γ ont en réalité fixé un nombre de groupements pyridoyls beaucoup moins élevé que ne le laissaient supposer nos dosages antérieurs et qu'au contraire la protéine isomère α s'est comporté d'une manière inverse. Les dosages antérieurs n'étaient certes pas très précis, mais leur confirmation par la répétition des essais et l'utilisation simultanée de plusieurs techniques nous permet de leur accorder un crédit suffisant.

Aussi proposons-nous l'hypothèse suivante : le groupement hétérocyclique, introduit dans la molécule d'albumine bovine, bloque non seulement les fonctions aminées mais apporte en outre à cette protéine un nouveau groupement basique, l'azote pyridique pouvant en effet devenir donneur d'électrons. Ce groupement est donc susceptible de réagir à son tour sur le colorant. De nombreuses théories ont été avancées pour expliquer la réaction colorant-protéine. Actuellement, comme l'ont montré Chapman et Schmidt [33, 34], l'hypothèse de Grollman [86] tendant à assimiler la réaction entre colorant et protéine à un phénomène d'adsorption est abandonnée. Ces auteurs se rallient par contre aux théories de Loeb qui considère cette fixation comme un phénomène plus chimique que physique, car la fixation sur les fonctions amine se fait dans des proportions stoechiométriques. Nous pourrions envisager, pour expliquer la combinaison du colorant avec le groupement pyridique, la formation d'une liaison semi-polaire entre l'azote pyridique donneur d'électrons et l'ion H^+ très faiblement dissocié de la fonction phénol du colorant. Le pouvoir donneur d'électrons de l'azote pyridique est contrarié en position γ et

TABLEAU XXV

DOSAGE DES GROUPEMENTS BASIQUES ET ACIDES

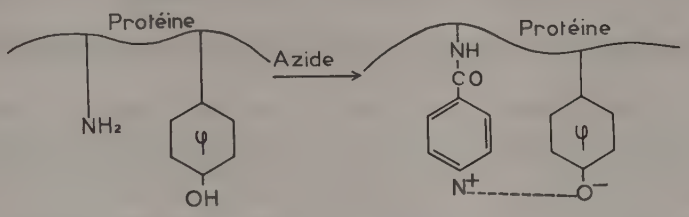
GROUPEMENTS DE LA PROTÉINE EXPRIMÉS EN NOMBRE D'ÉQUIVALENTS PAR GRAMME DE PROTÉINE × 10^4		ALBUMINE BOVINE	PICOLYLALBUMINE BOVINE		ISONICOTYLALBUMINE BOVINE			NICOTYLALBUMINE BOVINE		
			Groupements pyridiques fixés par molécule		Groupements pyridiques fixés par molécule			Groupements pyridiques fixés par molécule		
			31	46	37	44	50	40	55	80
Gr. basiques (en équivalents acides)	théoriques	14,5	9,81	7,55	8,91	7,85	6,94	8,45	6,19	2,41
	trouvés	14,7	7,08	6,55	11,67	11,77	10,13	13	13,27	11,5
Gr. acides (en équivalents basiques)	théoriques	18,03								
	trouvés	17,8	14,27	14,80	15,19	15,28	13,99	15,74	15,74	13,57

surtout α par l'effet inductif —I du groupement —CO et l'effet mésomère de la conjugaison —C=O, —N=C. L'effet inductif —I de —CO, stabilisé par l'effet mésomère, se fait d'autant plus sentir en position α que la conjugaison est directe alors qu'en position γ il se transmet à travers la chaîne. En position β, où au contraire la conjugaison n'est pas possible, il résulte que l'azote pyridique peut plus facilement jouer le rôle de donneur d'électrons vis-à-vis de molécules extérieures et leur fournir éventuellement une liaison semi-polaire.

En définitive la fixation de colorant sur le noyau pyridique, bien qu'incomplète, serait plus importante pour la protéine isomère β que pour le dérivé γ; elle est pratiquement nulle pour le dérivé α. Nous attribuons le nombre un peu faible de fonctions basiques dosées dans la picolylalbumine bovine à une imprécision de la méthode dans le cas des protéines possédant un nombre de groupements basiques peu élevés. En effet

Fraenkel-Conrat signale des erreurs de plus de 10 p. 100 dans le dosage de telles protéines.

Si nous examinons à présent le dosage des fonctions acides des protéines modifiées, nous remarquons que le nombre de ces fonctions s'avère, dans tous les cas, inférieur à celui d'une albumine bovine native. Ceci laisse à penser qu'il s'agit non seulement d'une diminution du nombre des fonctions carboxyliques libres, mais aussi de la diminution des groupements phénoliques. Rappelons les différences que nous avons observées en mettant en œuvre la technique de Folin-Ciocalteu (voir p. 73). Il est difficile d'envisager une substitution de la fonction phénol de la tyrosine par un groupement hétérocyclique. En effet les azides n'agissent sur le groupement phénol, pour donner des uréthannes, que dans des conditions expérimentales très particulières : solvant anhydre, température élevée [152, 153, 150], ce qui ne correspond absolument pas à la technique préparatoire de nos protéines. Nous avons d'ailleurs vérifié, qu'à froid et en milieu basique, les azides pyridine-monocarboxyliques ne donnent aucun produit de condensation avec les phénols du type paracrésol. Il faut donc plutôt songer, soit à un empêchement stérique, le groupement pyridoyl étant suffisamment encombrant pour masquer la fonction phénolique, soit à une réaction secondaire du nouveau groupement introduit. On peut admettre un schéma du type suivant :



Partie expérimentale

La technique de Fraenkel-Conrat est réalisée avec les réactifs suivants :

Solutions de colorant

Solution d'orange G à 0,1 p. 100
Solution de safranine O à 0,2 p. 100.

Les colorants sont pesés après dessication à 70 °C.

Il est absolument indispensable d'utiliser des produits spécialement destinés à cet usage, la plupart des colorants du commerce s'avérant très impurs [74]. Nous avons obtenu de bons résultats avec l'orange G de la firme Matheson, Coleman & Bell (Norwood, Ohio), et avec la safranine O de la National Aniline (New York).

Signalons que l'orange G (Geigy) et la safranine O (B.L.B.) n'ont pas donné de résultats superposables à ceux de Fraenkel-Conrat pour l'albumine bovine et l'insuline.

Solutions tampons

*p*H = 2,20	acide citrique 0,1 M	980 ml
	phosphate disodique 0,2 M	20 ml
*p*H = 11,50	phosphate disodique 0,2 M	250 ml
	NaOH 0,1 N	200 ml
	eau q.s.p.	1000 ml

Protocole opératoire

Dans des tubes à centrifuger de 15 ml (*) on ajoute :

protéine lyophilisée..... 5 mg
tampon ..... 1 ml
solution de colorant ... 1, 2, 3 ou 4 ml
deux billes de verre

L'albumine se dissout dans le tampon et est précipitée par le colorant. Les suspensions sont agitées mécaniquement pendant 24 heures. Elles sont ensuite centrifugées et la quantité de colorant, non utilisée par la protéine, est déterminée au moyen du spectrophotomètre Unicam en cuve de 1 cm d'épaisseur, dans le surnageant dilué au 1/100 pour le dosage des groupements basiques ($\lambda = 482\,m\mu$), au 1/200 pour celui des groupements acides ($\lambda = 518\ m\mu$). Le colorant lié à la protéine est calculé en soustrayant l'excès, trouvé dans le surnageant, de la quantité de colorant ajoutée. Lorsque la quantité de colorant fixé est stable la saturation de la protéine est atteinte. On prend la valeur moyenne de cette quantité.

(*) Nous avons fait 12 tubes par échantillon de protéine, soit 4 tubes pour chaque concentration différente.

B. — ACTION DE L'AZIDE ISONICOTIQUE SUR LA SÉRUM-ALBUMINE BOVINE DÉSAMINÉE

Pour confirmer encore la participation des groupements amine dans la réaction des protéines avec les azides pyridiques, nous avons effectué une expérience sur la sérum-albumine bovine désaminée.

Cette protéine a été traitée par la technique de PHILPOTT et SMALL [143] selon les modalités suivantes :

10 ml d'une solution à 1 p. 100 d'albumine bovine dans du tampon acétate de sodium de pH = 4,00 sont traités par un volume égal d'une solution de nitrite de sodium 2 M en agitant. L'action doit se faire à 0 °C, on laisse 24 heures en repos au frigidaire à 0 °C, on dialyse et on lyophilise.

A titre de contrôle, nous avons vérifié que l'albumine ainsi traitée a une mobilité électrophorétique très augmentée et conserve son pouvoir antigénique vis-à-vis d'un immun-sérum anti-albumine bovine [160].

Après la désamination la protéine a été soumise à l'action de l'azide *iso*nicotique dans les conditions décrites plus haut (voir p. 58). Après ce dernier traitement nous n'avons pu mettre en évidence par la réaction de König aucun noyau pyridique.

C. — IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS BLOQUÉS PAR LE GROUPEMENT PYRIDIQUE

Nous avons vu précédemment que l'hydrolyse acide libère totalement et quantitativement le groupement pyridoyle de la protéine en en permettant le dosage. Nous savons aussi que les bactéries sont incapables d'utiliser pour leur développement des acides aminés dont la fonction amine est bloquée par ce même groupement. Il est donc vraisemblable de penser qu'une hydrolyse enzymatique par protéase d'origine bactérienne est susceptible de provoquer la dégradation d'une protéine sans libération du résidu pyridique qui pourrait s'être fixé sur un aminoacide. Nous avons donc pratiqué l'hydrolyse enzymatique des trois protéines isomères au moyen de la protéase du *Streptomyces griseus* (*).

Protocole opératoire

2 ml d'une solution de protéine à 1,5 g p. 100 et de pH = 7,00 ont été dénaturés pendant cinq minutes au B.M. à 100 °C, puis, après refroidissement à 40 °C, additionnés de 0,2 ml d'un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH = 7,00 et de 2 mg de pronase [96]. Nous avons suivi chromatographiquement l'hydrolyse. Elle débute dès la première demi-heure et après deux heures environ un léger dépôt se forme et le surnageant est absolument limpide. L'étude qui suit a été réalisée à partir d'un hydrolysat de nicotylalbumine bovine, substituée par 80 groupements, obtenu après 8 heures de B.M. à 40 °C.

L'analyse qualitative de 40 µl d'hydrolysat déposés en 2 spots distincts est effectuée sur papier Whatman n° 1 avec le système butanol-acide acétique-eau (BAE (**)) en chromatographie ascendante. Pour obtenir une meilleure séparation des taches nous avons fait monter le solvant à deux reprises comme le préconise BLOCK et WEISS [16]. L'un des spots est révélé à la ninhydrine, réactif des fonctions amine libres, l'autre, au bromure de cyanogène/benzidine, révélateur du groupement nicotyle.

Résultats :

La figure 29 reproduit un chromatogramme typique. On constate de nombreuses taches révélées par la ninhydrine et des taches moins nombreuses mises en évidence par la réaction de König. Ne nous intéressent bien entendu que les spots révélables à la fois

(*) Cette préparation enzymatique est commercialisée par la firme Calbiochem, Los Angeles, sous le nom de « Pronase ».

(**) n-butanol - acide acétique - eau (78 : 5 : 17, v/v).

dans les deux systèmes, spots correspondant à des aminoacides (ninhydrine +) substitués par un radical pyridique (König +) ; ce sont les taches 1, 2 et 3.

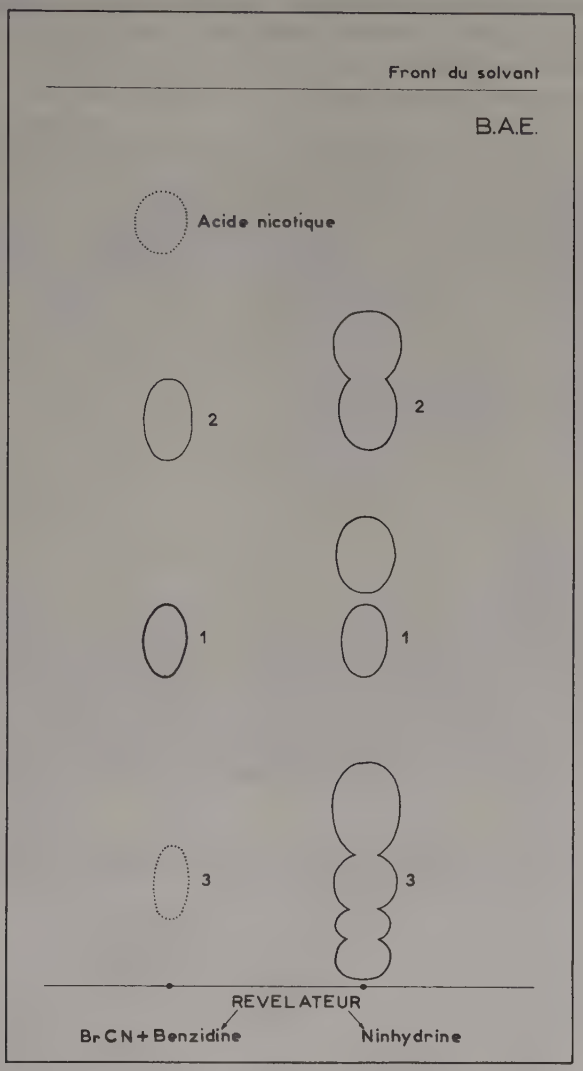


FIGURE 29
Chromatographie unidimensionnelle de l'hydrolyse enzymatique d'une nicotylalbumine bovine.

La tache 1 isolée est très intense; la tache 2, moins bien séparée, est de coloration plus faible; la tache 3, encore plus pâle, correspond à une région riche en acides aminés ou petits peptides mal séparés.

Pour identifier ces trois spots nous avons procédé à des chromatographies préparatives en déposant sur le papier 200 µl d'hydrolysat sous la forme d'une large bande. On élue les zones intéressantes avec une solution diluée de carbonate de sodium. On recueille 0,1 ml environ d'éluat. Nous avons vérifié par l'un des révélateurs que l'élution était totale. L'éluat subit alors une hydrolyse acide avec deux ou trois fois son volume d'HCl concentré, en ampoule scellée au B.M. à 100 °C pendant 18 à 20 heures. Après évaporation sous vide en présence de P_2O_5 et de pastilles de NaOH, le résidu est repris par le minimum d'eau légèrement carbonatée.

Une étude chromatographique ascendante et monodimensionnelle du résidu est effec-

tuée, d'une part avec le solvant BAE, d'autre part avec le solvant phénol-ammoniaque Ph Am (*). Les spots sont faits en double pour permettre une coloration par les révélateurs spécifiques des acides aminés et du noyau pyridique. Nous avons opéré en présence de témoins, aminoacides ou composés pyridiques.

Nous donnons sous forme de tableau les résultats de l'analyse de la tache 1 (tableau XXVI). Il en ressort que l'acide aminé sur lequel est fixé le groupement nicotyle est donc la lysine.

TABLEAU XXVI

ANALYSE QUALITATIVE DE LA TACHE 1 AVANT ET APRÈS HYDROLYSE ACIDE

SOLVANTS	RÉVÉLATION A LA NINHYDRINE		RÉVÉLATION AU BrCN + BENZIDINE	
	avant hydrolyse	après hydrolyse	avant hydrolyse	après hydrolyse
BAE	1 tache $R_f = 0,35$	1 tache $R_f = 0,03$ (comme le témoin lysine)	1 tache de coloration rose $R_f = 0,35$	1 tache de coloration orangée $R_f = 0,85$ (comme l'acide nicotique)
Ph Am		1 tache $R_f = 0,77$ (comme le témoin lysine)		1 tache de coloration orangée $R_f = 0,71$ (comme l'acide nicotique)

Nous avons élué également la bande de papier correspondant à la tache 2. Comme nous le montre la figure 29, cette tache est contiguë à une autre tache ninhydrine positive. Pour vérifier si elle avait pu être isolée avec précision, nous avons fait subir à l'éluat une nouvelle chromatographie mais en solvant Ph Am. Nous n'avons obtenu qu'une seule tache positive avec les deux révélateurs. On pratique alors une élution sur la bande réservée à cet effet et, comme précédemment, l'éluat subit une hydrolyse par HCl concentré. Le résultat en est donné dans le tableau XXVII.

Pour la tache 2 l'acide aminé sur lequel est fixé le groupement nicotyle est donc l'arginine. Nous avons confirmé l'identité de ce composé guanidique en pratiquant la réaction de Sakaguchi, selon la technique de ACHER et CROKER (**) [1]. La coloration rose donnée par l'arginine est nettement décelable.

TABLEAU XXVII

ANALYSE QUALITATIVE DE LA TACHE 2 AVANT ET APRÈS HYDROLYSE ACIDE

SOLVANTS	RÉVÉLATEUR A LA NINHYDRINE		RÉVÉLATEUR AU BrCN + BENZIDINE	
	avant hydrolyse	après hydrolyse	avant hydrolyse	après hydrolyse
BAE	1 tache $R_f = 0,60$	1 tache $R_f = 0,09$ (comme le témoin arginine)	1 tache de coloration rose $R_f = 0,60$	1 tache de coloration orangée $R_f = 0,85$ (comme l'acide nicotique)
Ph Am	1 tache $R_f = 0,75$	1 tache $R_f = 0,86$ (comme le témoin arginine)	1 tache de coloration rose $R_f = 0,75$	1 tache de coloration orangée $R_f = 0,71$ (comme l'acide nicotique)

(*) A 80 ml de phénol fraîchement distillé on ajoute 20 ml d'eau et 0,5 ml d'NH_4OH.

(**) Pulvérisation d'une solution d'α-naphtol à 0,01 p. 100 dans de l'éthanol contenant 5 g p. 100 d'urée et à laquelle on ajoute avant l'emploi des pastilles de KOH à raison de 5 pastilles pour 10 ml (concentration finale 5 g. p. 100). On sèche à l'air quelques minutes. On pulvérise légèrement une solution d'hypobromite de sodium préparée par dissolution de 0,7 ml de brome dans 100 ml de soude à 5 p. 100. La sensibilité de la réaction est de 0,2 p. μg.

Nous avons été moins heureuse avec la troisième tache d'intensité beaucoup plus faible. Nous avons élué la zone 3 et fait subir à l'éluat une chromatographie ascendante en Ph Am. Cette dernière a permis la séparation de 5 taches dont une, très faiblement positive à la ninhydrine, l'était aussi au BrCN. Après élution et hydrolyse nous n'avons plus trouvé trace de produits. Peut-être étions-nous en dehors des limites de sensibilité des révélateurs.

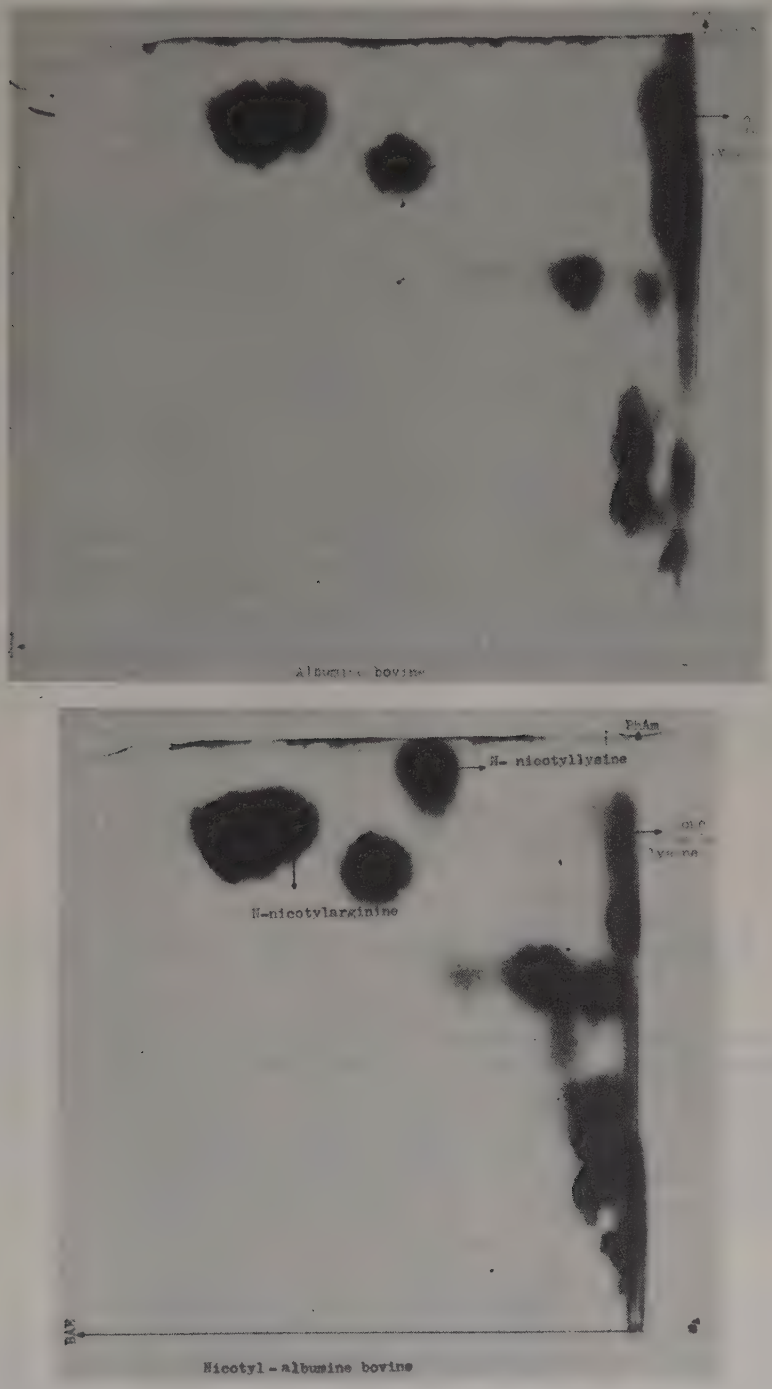


FIGURE 30

Chromatographie bidimensionnelle d'hydrolysats enzymatiques de sérum-albumine native et de nicotyl-sérum-albumine.

Cette tache correspond peut-être à l'acide aminé N-terminal de la sérum-albumine bovine, identifié à l'acide aspartique [62]. On peut également envisager la réaction avec l'azide du groupement thiol du seul reste de cystéine. D'ailleurs ces deux aminoacides ont des R_f très voisins et voisins également de ceux que nous avons décelés sur les chromatogrammes.

Signalons au passage la libération, au cours de l'hydrolyse enzymatique bactérienne, d'un peu d'acide nicotique (fig. 29). Il ne se trouve pas à l'état libre dans la protéine comme nous l'avons vérifié par chromatographie. Il semble donc qu'une faible quantité de résidus se soit détachée du support protéique, peut-être sous l'influence hydrolysante de la pronase. Nous ne pensons pas qu'elle ait une origine autre que les deux acides aminés précités. Une technique plus fine telle que l'électrophorèse à haute tension et la chromatographie combinées, technique des « finger print », aurait peut-être permis de trancher les deux problèmes en suspens.

Pour avoir une vue d'ensemble de l'hydrolyse enzymatique par la pronase, nous avons fait une chromatographie ascendante et bidimensionnelle des hydrolysats de nicotylalbumine et d'albumine native (40 µl) avec les systèmes B A E et Ph Am. La coloration a été développée par la ninhydrine. Les chromatogrammes de la figure 30 illustrent cette expérience et permettent une comparaison des deux hydrolysats.

Remarquons la présence d'une tache supplémentaire sur le chromatogramme de l'hydrolysat de sérum-albumine traitée. Cette tache correspond exactement à la nicotyl-lysine. La lysine non bloquée, de R_f élevé en Ph Am et au contraire très faible en BAE, se trouve vraisemblablement située dans la zone de forte densité que l'on remarque sur le témoin et qui est absente sur le chromatogramme de l'albumine modifiée. Nous signalons en outre l'emplacement de la nicotylarginine.

L'hydrolysat de l'*iso*nicotylalbumine bovine donne un chromatogramme entièrement superposable. L'hydrolysat d'une picolylalbumine au contraire montre, pour la picolyl-lysine, un R_f avec le B A E légèrement supérieur à celui de la nicotyl-lysine; la tache se trouve alors en position très voisine de celle de la picolyl-arginine.

En conclusion nous pouvons affirmer que la fixation du résidu pyridique se fait principalement sur deux acides aminés basiques, la lysine et l'arginine. Ces deux aminoacides représentent 79 groupements par molécule d'albumine bovine, chiffre qui confirme les résultats de nos dosages.

Section II

Quelques propriétés biologiques des pyridoyl-protéines

Nous avons montré que le traitement d'une protéine par les divers azides de la série pyridique permet l'introduction sur la macromolécule de restants hétérocycliques qui se fixent tout spécialement sur les molécules de lysine et d'arginine. Quelles répercussions cette modification chimique entraîne-t-elle dans les propriétés biologiques de la protéine native ? C'est ce que nous allons examiner dans cette deuxième section. Nous avons surtout étudié les modifications immunitaires des protéines traitées. Nous avons également réalisé quelques expériences dans le domaine enzymatique.

I. — RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES

La réaction de précipitation antigène-anticorps est le phénomène immunologique qui a principalement été l'objet des préoccupations des biochimistes. Les études innombrables sur cette réaction, qui permet d'étudier in vitro un des aspects des défenses de

l'organisme, fournirent des renseignements importants sur la nature même des antigènes, des anticorps et sur leur mode de liaison. Des mises au point périodiques sur nos connaissances concernant ce problème, nous ne retiendrons que les plus récentes (*) [94, 118, 175, 154, 89, 164, 81] dont nous tirerons, au fur et à mesure de l'exposé de nos travaux, les données essentielles sur lesquelles nous baserons l'interprétation de nos recherches. La plupart des antigènes naturels sont constitués par des protéines et presque toutes les protéines manifestent un pouvoir antigénique spécifique. Nous savons par ailleurs que les anti-corps sont constitués par des macromolécules appartenant principalement au groupe des γ-globulines. Aussi avons-nous étudié ces deux aspects des caractères immunitaires des protéines.

A. — POUVOIR ANTIGÉNIQUE DES PROTÉINES MODIFIÉES

En vue d'une étude de la spécificité des réactions sérologiques des dérivés de la pyridine sous l'angle de l'isomérie et du mode de liaison, nous avons préparé des sérums de lapin antisérum-albumine bovine native (anti-SAB) ainsi que les anti-sérums correspondant à la nicotyl-sérum-albumine bovine (anti-NSAB), à la picolyl-sérum-albumine bovine (anti-PSAB) et à l'*iso*nicotyl-sérum-albumine bovine (anti-ISAB). Par ailleurs, nous avons également immunisé des lapins avec une sérum-albumine bovine à laquelle avait été copulée par diazotation la seule amine pyridique facilement diazotable, l'amino-3-pyridine; l'anti-sérum obtenu sera appelé l'anti-β-ASAB. Dans chaque série plusieurs animaux ont été immunisés.

Les propriétés de nos anti-sérums ont été mises en évidence par la réaction de précipitation spécifique en milieu gélosé ou en milieu liquide; nous avons également utilisé la méthode d'inhibition hapténique en milieu liquide.

1° *Etude de la précipitation antigène-anticorps*

Nos cinq groupes d'anti-sérums (anti-SAB; anti-PSAB; anti-NSAB; anti-ISAB et anti-β-ASAB) ont été mis en présence de différents antigènes :

— soit de la protéine qui a servi à la préparation de l'anti-sérum correspondant (réaction strictement spécifique);
— soit des protéines utilisées pour la préparation des autres anti-sérums (étude des réactions croisées, portant sur le groupement hapténique pyridique introduit);
— soit de sérum-albumine humaine (SAH);
— soit enfin de sérum-albumine humaine modifiée par l'action de divers azides pyridiques : PSAH, NSAH ou ISAH (étude des réactions croisées, portant sur la partie protéidique de l'antigène).

Les réactions antigène-anticorps ont été mises en évidence :

— par micro-immunoélectrophorèse. L'antigène testé a été soumis à la migration électrophorétique et l'immun-sérum introduit dans la gouttière de diffusion. Nous avons utilisé la micro-technique de Scheidegger [155].
— par simple diffusion en milieu gélosé, selon la technique d'Ouchterlony [141];
— dans quelques cas enfin, et particulièrement pour contrôler des résultats douteux, nous avons examiné la réaction antigène-anticorps en milieu liquide homogène, selon la technique d'Heidelberger [91, 92].

Nous remarquons en premier lieu (tableau XXVIII) que les anti-sérums pyridoyl-albumines bovines précipitent abondamment avec l'antigène qui a servi à leur préparation. L'introduction de résidus pyridiques au niveau des groupements —NH_2 de la lysine et de l'arginine d'une protéine ne lui fait donc pas perdre le pouvoir antigénique. Par ailleurs le nouvel antigène réalisé donne toujours lieu, avec l'anti-sérum correspondant, à une réaction antigène-anticorps qui se traduit par une floculation.

Dans les immunoélectrophorèses l'arc de précipitation est très décalé par rapport au point de départ, ce qui témoigne d'une grande mobilité de la protéine antigène modifiée; nous avons déjà signalé cette propriété plus haut (voir p. 75).

(*) Pour la période antérieure à 1948, on consultera la thèse de Neuzil [130].

En outre les antisérums que nous avons préparés permettent d'observer d'intéressantes réactions croisées. Ces réactions peuvent porter :

a — sur le comportement du sérum anti-SAB vis-à-vis de son antigène spécifique modifié par une substitution pyridique;

b — sur le comportement des anti-sérums préparés avec des antigènes à substitution pyridique vis-à-vis de l'antigène natif;

c — sur la position spatiale de l'azote hétérocyclique du noyau pyridique;

d — sur le mode de liaison du groupement pyridique;

e — sur la partie protéique de l'antigène.

a) Le sérum de lapin anti-SAB se montre encore capable de réagir, bien que faiblement, avec la sérum-albumine bovine dans laquelle nous avons introduit des restes d'acides picolique, nicotique ou *iso*nicotique. Bien plus, lorsque le noyau pyridique est lié à la protéine par diazotation, la précipitation s'effectue avec autant d'intensité qu'avec l'antigène correspondant.

Le sérum anti-SAB montre une faible réaction croisée avec la sérum-albumine humaine; cette réaction diminue encore d'intensité lorsque la SAH est substituée par des restants pyridiques

TABLEAU XXVIII

ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ET DES RÉACTIONS CROISÉES PAR ANALYSE IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE

IMMUNSÉRUMS		ANTIGÈNES								
		BOVINS					HUMAINS			
		SAB	PSAB	NSAB	ISAB	β-ASAB	SAH	PSAH	NSAH	ISAH
anti-SAB	1	+++; 1	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3	+++; 2	+; 1	± ; 3	± ; 3	+ ; 3
	2	+++; 1	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3	+++; 2	+; 1	± ; 3	± ; 3	± ; 3
anti-PSAB	1	+++; 1	+++; 3	++; 3	+++; 3	+++; 2	0	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3
	2	+++; 1	+++; 3	++; 3	+++; 3	+++; 2	0	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3
anti-NSAB	1	0	+ ; 3	++; 3	++ ; 3	0	0	± ; 3	+ ; 3	+ ; 3
	2	0	++ ; 3	+ ; 3	++ ; 3	0	0	± ; 3	+ ; 3	0
anti-ISAB	1	0	+ ; 3	++; 3	++ ; 3	0	0	± ; 3	+ ; 3	+ ; 3
	2	0	+ ; 3	++; 3	++ ; 3	0	0	± ; 3	+ ; 3	+ ; 3
anti-β-ASAB	1	+++; 1	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3	+++; 2	0	± ; 3	± ; 3	± ; 3
	2	+++; 1	+ ; 3	+ ; 3	+ ; 3	+++; 2	0	± ; 3	± ; 3	± ; 3

Dans chaque case le degré de précipitation est indiqué par 0, ±, +, ++, +++; la position de l'arc de précipitation par rapport au point de dépôt de l'antigène, par le chiffre 1, 2, 3.

b) Les sérums de lapin anti-ISAB et anti-NSAB ne donnent lieu à aucune précipitation avec l'antigène natif (SAB). Au contraire le sérum anti-PSAB réagit aussi bien avec SAB qu'avec PSAB. Cette différence est bien réelle et ne peut provenir d'une impureté de la préparation ayant servi à immuniser l'animal : on note en effet de grandes différences dans la position des arcs de précipitation, qui montrent bien que la réaction immunologique s'est effectuée avec la protéine modifiée, dans un cas, avec la protéine native dans l'autre (fig. 31). Il semble donc que le groupement déterminant nouveau introduit dans la molécule se comporte d'une manière très différente selon que l'on a affaire à un dérivé α ou à un dérivé β ou γ, ces deux dérivés apparaissant immunologiquement très voisins. Cette influence de l'isomérie n'est pas un fait récent. Nous trouvons très bien définie dans une étude de Goebel et Avery [79] l'importance de la distribution spatiale des atomes et groupements d'atomes.

c) La conclusion précédente n'est cependant pas confirmée par l'étude des réactions croisées entre les sérums anti-ISAB, anti-PSAB, anti-NSAB et les antigènes correspondants. Le groupement pyridique, introduit sous la forme de restes d'acides pyridine-carboxyliques, fait naître un anticorps de spécificité pyridine-carboxylique qui ne différencie pas les trois positions spatiales possibles du noyau hétérocyclique.

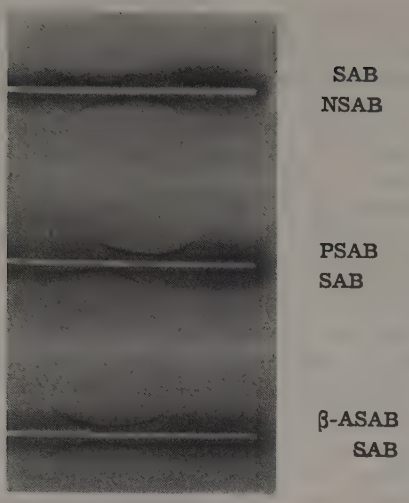


FIGURE 31

Etude du sérum anti-PSAB vis-à-vis de différents antigènes.

Immunoélectrophorèse selon Scheidegger.
Les différents antigènes, après migration dans le champ électrique, ont été mis en présence du sérum anti-PSAB.

d) Nous retrouvons encore un comportement particulier des dérivés de la série picolique lorsqu'on examine les réactions croisées des immunsérums anti-ISAB, anti-PSAB et anti-NSAB vis-à-vis de l'antigène β-ASAB, dans lequel, rappelons le, un noyau pyridique en position β est lié à la protéine par un groupement azoïque (la liaison s'effectue vraisemblablement sur des restes de tyrosine). En effet, la réaction croisée n'est fournie ni par le sérum anti-ISAB, ni par le sérum anti-NSAB qui cependant correspond également à un noyau pyridique substitué en β; la réaction croisée s'observe au contraire avec le sérum anti-PSAB, qui flocule aussi bien β-ASAB que PSAB.

Signalons encore que le sérum anti-β-ASAB manifeste une large réactivité s'étendant à la sérum-albumine bovine native et, plus faiblement, à la sérum-albumine bovine substituée par des restes d'acides pyridine-carboxyliques. Ces différences, imputables au mode de liaison du groupement hapténique nouveau introduit, confirment les résultats antérieurs de MUTSAARS et GREGOIRE dans la série aromatique [128] : ces auteurs avaient montré qu'un même groupement manifestait un pouvoir antigénique différent selon qu'il était uni à la molécule de protéine par une liaison azoïque ou une liaison uréide.

e) L'introduction dans la protéine de restes d'acides pyridine-carboxyliques fait apparaître un pouvoir antigénique nouveau : en effet, l'injection au lapin d'un des trois antigènes ISAB, PSAB ou NSAB permet la récolte d'un immunsérum inerte vis-à-vis de la sérum-albumine humaine native (SAH), mais précipitant la SAH lorsque cette protéine est substituée par des restes d'acides pyridine-carboxyliques; nous avons obtenu un résultat identique en remplaçant la SAH par une γ-globuline humaine; dans ces cas, on n'observe d'ailleurs qu'une assez faible importance de la position spatiale de l'azote hétérocyclique. Remarquons enfin que le sérum anti-β-ASAB donne des résultats très voisins avec des antigènes d'origine humaine.

2° *Etude de l'inhibition hapténique*

L'étude des haptènes donne de nombreux renseignements sur les groupes déterminants de la spécificité immunologique; ce chapitre de l'histoire des antigènes est dominé par les travaux de LANDSTEINER. La méthode de Landsteiner consiste à fixer un radical R sur une protéine par l'intermédiaire de la liaison diazoïque de façon à obtenir un antigène semi-artificiel dont on connaît ainsi parfaitement l'un des motifs prépondérants de la

structure superficielle. En effet l'anticorps A correspondant réagit non seulement avec l'antigène, mais aussi avec une série de composés qui portent le même radical R. Ce radical R forme le haptène ou groupement déterminant.

Lorsqu'on met alors en présence antigène, haptène et anticorps, il y a compétition entre l'antigène et le haptène et il en résulte une inhibition totale ou partielle de la réaction de précipitation. Dans le domaine des haptènes hétérocycliques, NISONOFF et PRESSMAN [137] se sont attachés à déterminer quantitativement le pouvoir inhibiteur d'une série de substances voisines des groupes hapténiques, 3-azopyridine et azobenzène, vis-à-vis de sérums homologues à ces groupements.

La réaction de précipitation en présence de haptène a été réalisée par la technique d'Heidelberger. Pour doser la quantité de précipité formé nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu. Une série d'expériences préliminaires nous a permis de déterminer, par les techniques précitées, la proportion d'antigène nécessaire pour obtenir le maximum de précipité. La courbe (fig. 32) obtenue pour chaque sérum est du type classique « lapin », avec un maximum bien défini. Nous avons en outre établi, par micro-Kjeldahl, la correspondance du maximum en azote protéique. (Pour les préparations des anti-sérums, de l'antigène -3-azopyridine et les détails de la réaction avec l'antigène et le haptène, cf. partie expérimentale).

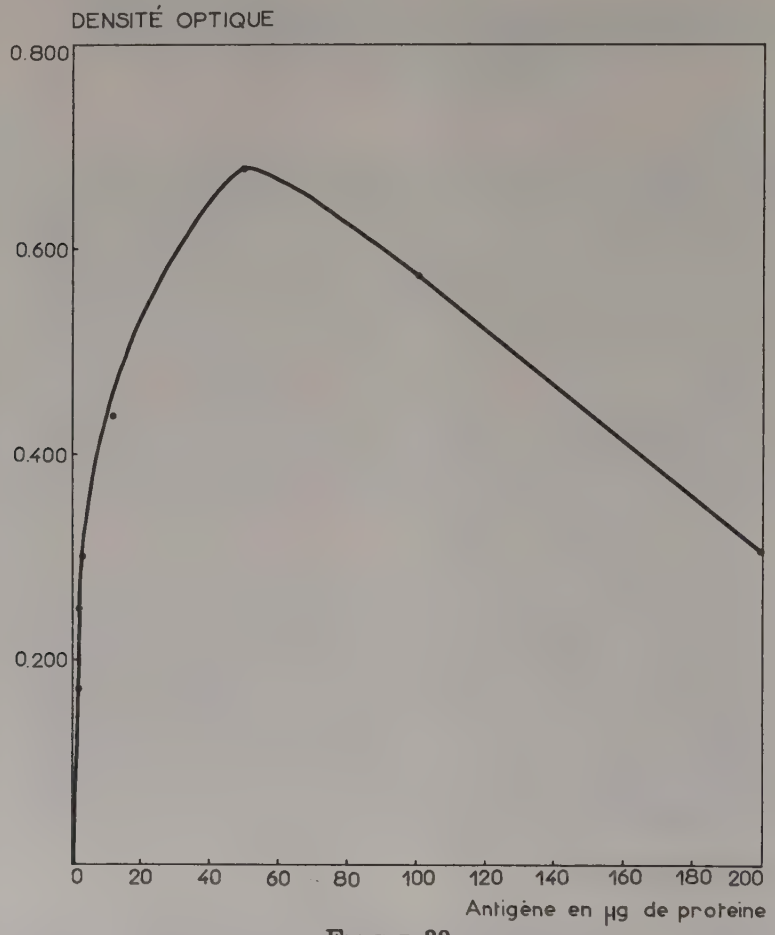


FIGURE 32

Etude quantitative de la précipitation spécifique.

Réaction sérum anti-PSAB (en quantité constante) vis-à-vis de quantités croissantes de l'antigène correspondant. Dosage du précipité par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Nous avons groupé dans le tableau XXIX les résultats relatifs aux couples antigène-anticorps correspondant aux trois isomères de position. Les expériences ont été réalisées à deux concentrations en haptène puisque l'inhibition hapténique ne s'avère pas proportionnelle à la concentration en haptène.

TABLEAU XXIX

ÉTUDE DE L'INHIBITION HAPTÉNIQUE

HAPTÈNES	POURCENTAGE DE PRÉCIPITÉ					
	CONCENTRATION MOLÉCULAIRE DU HAPTÈNE, × 10^6					
	5334			2667		
	PSAB-anti PSAB	NSAB-anti NSAB	ISAB-anti ISAB	PSAB-anti PSAB	NSAB-anti NSAB	ISAB-anti ISAB
Pyridine	95	92	81	100	100	85
Acide picolique	92	69	80	100	88	82
Acide nicotique	100	62	79	100	75	93
Acide *iso*nicotique	100	72	75	100	85	79
Hydrazide picolique	77	77	71	87	84	84
Hydrazide nicotique	83	47	73	100	66	75
Hydrazide *iso*nicotique	78	65	67	95	87	71
Nicotamide	86	48	71	97	62	78
*Iso*nicotamide	97	68	59	100	85	71
Acide nicotinurique	80	36	68	86	42	73
N-*iso*nicotyl-DL-leucine	87	63	59	95	80	73
Acide quinolique	87	70	84	98	77	90
Acide pipécolique	87	66	83	95	85	90
Amino-2-pyridine	94	72	73	100	87	79
Amino-3-pyridine	89	70	77	100	100	85
Pipérazine	95	80	86	100	91	90
Acide benzoïque	88	68	77	95	75	84
Acide salicylique	78	47	64	87	75	82

Le composé pyridique le plus simple, la pyridine, ne manifeste vis-à-vis des systèmes précipitants qu'une inhibition minime, sauf dans le cas de l'ISAB. Les trois acides pyridine-carboxyliques isomères n'entraînent aucune modification de la précipitation dans le système PSAB-anti-PSAB; l'inhibition due à ces composés est bien nette dans les deux autres couples immunologiques, la spécificité spatiale étant assez visible pour la plus faible concentration en haptène. On retrouve cette spécificité dans le domaine des hydrazides pyridine β- et γ-carboxyliques.

C'est dans le groupe des amides que nous avons obtenu les résultats les plus significatifs, qu'il s'agisse des simples nicotamide ou *iso*nicotamide et surtout des amides pyridiques substituées que constituent l'acide nicotinurique et la N-*iso*nicotyl-leucine : les inhibitions observées sont très importantes et le caractère de spécificité spatiale fortement accusé.

Nous avons examiné également quelques autres composés hétérocycliques. L'acide quinolique, ou acide pyridine-2,3-dicarboxylique, se montre légèrement inhibiteur, surtout vis-à-vis du système NSAB-anti-NSAB, ce qui montre l'importance prépondérante de la fonction acide en β dans la molécule du diacide; cependant l'acide pipécolique ou acide pipéridine-2-carboxylique manifeste également son pouvoir inhibiteur maximum vis-à-vis du même système.

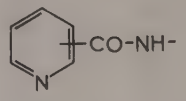
Les composés hétérocycliques basiques, amino-2-, amino-3-pyridine et pipérazine ont peu d'action sur la précipitation spécifique et ne manifestent aucune spécificité spatiale.

Remarquons enfin que des composés acides non hétérocycliques, comme l'acide benzoïque et surtout l'acide salicylique, se présentent comme des inhibiteurs assez puissants surtout dans le système NSAB-anti-NSAB.

Il est intéressant de comparer nos résultats avec ceux antérieurement publiés par NISONOFF et PRESSMAN [137]. Ces auteurs utilisent en réalité un système différent du

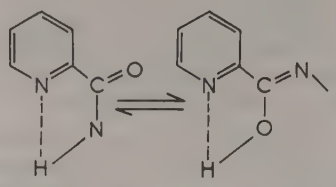
nôtre, puisqu'il s'agit d'une azoprotéine dont le radical R est constitué par l'amino-3-pyridine. Les inhibitions observées par les chimistes californiens s'avèrent nettement supérieures aux nôtres : la simple pyridine, en particulier, entraîne la disparition presque complète du précipité spécifique. Il est indéniable cependant, comme l'ont exposé Nisonoff et Pressman, que l'azote hétérocyclique n'est pas antigéniquement équivalent au groupement —CH= du benzène puisque la position des substituants par rapport à l'azote influence le pouvoir inhibiteur.

Il semble donc dans nos expériences que l'introduction du noyau pyridique dans la protéine ne modifie pas seulement le caractère antigénique initial par la présence d'un atome d'azote hétérocyclique, mais que la liaison elle-même du groupement acide pyridine-carboxylique intervient dans la détermination du nouveau pouvoir antigène. Ceci expliquerait l'importance relativement faible de la position du cycle pyridique que nous avons signalée en décrivant les réactions croisées entre les sérums anti-PSAB, anti-NSAB et anti-ISAB et les antigènes correspondants; cette hypothèse est également soutenue par le caractère inhibiteur assez marqué des amides des acides pyridine-carboxyliques qui présentent dans leur molécule le groupement —$CONH_2$ et surtout par l'inhibition manifeste de l'acide nicotinurique et de la N-*iso*nicotyl-leucine, substances qui possèdent toutes deux la même liaison amide que celles des protéines traitées par les azides des acides pyridines-carboxyliques. Comme la liaison amide est une liaison très banale de toutes les protéines, puisque la liaison peptidique n'est qu'un cas particulier de la liaison amide, nous pouvons supposer que le véritable groupement déterminant introduit est constitué par l'ensemble :



dans lequel l'isomérie du noyau peut être assez souvent mise en évidence.

Le comportement particulier des dérivés α, que nous avons signalé à plusieurs reprises, serait en rapport avec une interaction du groupement amide avec l'hétéroatome d'azote voisin, selon le schéma :



La participation du groupement carbonylé au nouveau déterminant antigénique expliquerait l'inhibition assez notable introduite par de simples acides non hétérocycliques comme l'acide benzoïque et salicylique. Rappelons en terminant qu'un certain nombre de travaux récents, en particulier ceux de Maurer et coll. [120, 158] et de ceux de Steinbuch et coll. [160], ont montré la faible importance des groupements aminés dans la manifestation du pouvoir antigénique, surtout en rapport avec la présence des groupements carboxyliques. Dans le traitement d'une protéine par un azide pyridique nous éliminons bien certaines fonctions aminées que l'on remplace par le cycle de la pyridine; mais en même temps nous créons une nouvelle liaison amide dont le groupement carbonylé manifeste probablement la même influence sur l'antigénicité de la molécule que le groupement carbonylé de la fonction carboxylique.

B. — PROPRIÉTÉS ANTICORPS DES PROTÉINES MODIFIÉES

Pour examiner l'influence de la fixation de restes d'acides pyridine-monocarboxyliques sur la fonction anticorps, nous nous sommes adressée à différents sérums de lapin et à des sérums humains. Dans nos expériences nous n'avons pas isolé la fraction

anticorps; actuellement il est admis en effet que les protéines immunitaires sont constituées d'au moins trois fractions :

— les γ-globulines de WALDENSTROM [170]; ce sont des protéines dont la mobilité électrophorétique est très disparate, allant de la zone α_2, à la zone γ, mais qui possèdent en commun une même structure antigénique;
— les β_2-macroglobulines;
— les β_{2A}-globulines;

ces deux dernières fractions se localisent dans une même région plus limitée du spectre électrophorétique; dans la nomenclature de HEREMANS [93] on les nomme les γ_{1M} et γ_{1A}-globulines.

La nature chimique de l'antigène, son mode d'administration (lieu et doses), la durée de l'immunisation, le caractère de l'organisme immunisé (espèce, animal, âge) sont autant de facteurs déterminants dans la production de l'un ou l'autre de ces trois types d'anticorps. Ainsi BENEDICT et coll. [9] qui ont injecté de l'albumine bovine à des lapins ont-ils montré la synthèse précoce des macroglobulines anticorps, s'effaçant pour laisser la place aux γ-globulines légères.

Par analyse immunoélectrophorétique inversée, c'est-à-dire en intervertissant les positions du sérum et de l'antigène, nous avons pour notre part localisé les anticorps de nos sérums dans la fraction des γ-globulines légères.

Nous avons directement fait agir les azides pyridiques sur le sérum entier, selon la méthode que nous avons décrite précédemment (voir p. 58). En effet, la préparation des protéines modifiées selon la technique de Clutton permet bien d'isoler les fractions albuminique et globulinique du sérum après fixation des groupements étrangers, mais leur remise en solution dans de l'eau légèrement alcaline ne reproduit pas le milieu initial.

CLUTTON préconise de plus l'emploi du dioxanne. Or GRANT [83] a montré le rôle inhibiteur de ce solvant dans la réaction de précipitation spécifique de la sérum-albumine bovine et de son anticorps. Cette inhibition proviendrait, non pas d'une dénaturation de l'antigène, mais de la formation de liaisons hydrogène entre le dioxanne et certains motifs immunologiques.

Comme nos expériences ont été réalisées sur le sérum total, il était important de connaître au préalable le comportement des différentes fractions protéidiques sous l'influence du traitement par les azides. L'électrophorèse en gélose (fig. 33) nous montre que les zones albuminique et globulinique sont encore bien distinctes; elles accusent cependant une forte augmentation de leur vitesse de déplacement électrophorétique; enfin il devient impossible d'individualiser les différentes fractions des globulines.

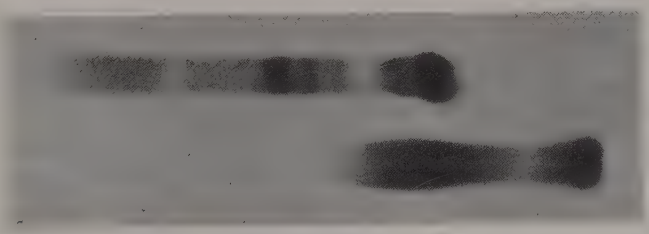


FIGURE 33
Electrophorèse du sérum de lapin.
en haut : sérum normal
en bas : sérum traité par l'azide *iso*nicotique.

Nous avons observé des résultats tout à fait superposables avec des sérums d'espèces différentes (lapin, cheval, homme) et avec les différents azides pyridiques.

Nous avons étudié l'influence de la modification du sérum-anticorps dans deux systèmes antigène-anticorps :

— un système précipitant,
— un système agglutinant.

1° *Système précipitant*

Nous avons examiné le système SAB-sérum de lapin anti-SAB. Le traitement de l'immunsérum a consisté à fixer, dans la proportion de 2,83 mg d'N hétérocyclique pour 0,15 à 0,20 g de protéine totale, des groupements nicotyle, *iso*nicotyle ou picolyle.

Dans toutes nos expériences sans exception les résultats sont identiques :

Mis en contact avec l'antigène selon la technique d'Heidelberger, l'antisérum modifié n'a donné lieu après 24 heures à aucun précipité; un témoin, dialysé et dilué au demi comme le sérum étudié, précipite normalement.

Un sérum de lapin anti-NSAB traité de la même façon par l'azide nicotique ne donne aucune réaction de précipitation avec son antigène correspondant.

On admet actuellement que l'union entre antigènes naturels et anticorps correspondants fait moins appel à des liaisons chimiques principales comme le pensait Landsteiner mais surtout à des forces d'attraction parmi lesquelles les forces électrostatiques de Coulomb et les liaisons hydrogènes joueraient un rôle prépondérant alors que les forces de Van der Waals interviendraient pour une moindre part.

Nous savons en effet que les protéines sont hérissées de fonctions ionisées $-NH_3^+$ ou $-COO^-$ en proportion variable suivant le *p*H du milieu où elles se trouvent. Si l'antigène possède une charge fonctionnelle négative telle que $-COO^-$ l'anticorps aura, face à ce site antigénique, une charge complémentaire $-NH_3^+$ par exemple, disposée sur son motif spécifique. Il s'exercera alors entre les radicaux des forces d'attraction électrostatiques formant ainsi une liaison du type ionique [27].

Dans le cas des antigènes et anticorps les radicaux chargés négativement sont surtout représentés par des groupes carboxyliques appartenant aux acides glutamique et aspartique, tandis que les radicaux chargés positivement proviennent surtout de la lysine [63] et de l'arginine. L'hydroxyle phénolique à charge négative de la tyrosine et le groupe imidazole à charge positive de l'histidine jouent un rôle moins important dans la formation du complexe antigène-anticorps. Ce dernier cependant interviendrait plutôt par formation de liaisons hydrogène qui s'établissent entre l'azote du groupement $-NH$ et l'oxygène d'un groupement $-COO^-$.

Nous avons vu précédemment le rôle négligeable des groupements $-NH_2$ de l'antigène dans la précipitation alors que l'estérification des groupes carboxyle entraîne la perte de la réactivité avec l'antisérum.

Si l'antigène n'intervient que peu par les groupes $-NH_2$ il n'en est pas de même de l'anticorps.

Ainsi une antitoxine diphtérique, dont 17 à 19 p. 100 des groupes aminés sont acétylés, ne flocule plus avec la toxine [80]. Le sérum antidiphtérique de cheval se montre également très sensible à l'action du formol [134, 135], autre composé réagissant assez spécifiquement avec les fonctions amine des protéines. Il en est de même des anticorps antipneumococciques type I traités par le formaldéhyde ou le cétène [37, 90].

Les antisérums de lapin traités par les azides ne possédant plus les groupements $-NH_2$ de la lysine et de l'arginine, susceptibles de réagir avec les groupes $-COO^-$ de l'antigène correspondant, ne sont donc plus capables de donner la réaction de précipitation. Il faut réserver toutefois la possibilité de l'existence de complexes solubles.

2° *Système agglutinant*

Nous avons étudié le pouvoir agglutinant du sérum humain normal vis-à-vis des hématies. Le sérum a été traité par des quantités croissantes des trois azides isomères correspondant à une proportion d'N hétérocyclique comprise entre 0,945 mg et 7,84 mg pour 0,15 g à 0,20 g de protéine; les *iso*agglutinines étant extrêmement sensibles au *p*H, nous avons vérifié au préalable que le *p*H auquel nous opérons et nécessité par le mode de préparation ne gênait pas par lui-même la formation de l'agglutinat. Tous les sérums ont été dialysés et amenés à demi-concentration après ajustement à $pH = 7{,}50$.

Nous avons réuni dans le tableau XXX les divers résultats obtenus avec des sérums B anti-A, A anti-B et O anti-A et anti-B (*). Ces trois sérums, avant tout traitement, présentaient un pouvoir agglutinant très prononcé, encore décelable aux dilutions respectives de 1/128, 1/64 et 1/128. Les résultats du tableau concernent le pouvoir agglutinant de sérums traités et finalement dilués au demi.

Il résulte de l'étude du tableau XXX que le pouvoir anti-érythrocytaire d'un sérum est inhibé par le blocage des groupements — NH_2 libres de la lysine et de l'arginine. Le sérum est d'autant plus sensible à cette fixation que son taux d'agglutination est plus faible et que cette dernière a été réalisée sur un sérum ne présentant qu'un groupe d'agglutinines. Nous avons réalisé une expérience avec un sérum fortement agglutinant; ce sérum O anti-A agglutinant au 1/256 présente encore un taux d'agglutination élevé vis-à-vis des hématies du groupe A, lorsqu'on fait agir 7,48 mg d'N hétérocyclique, mais les agglutinats sont très fins; ce même sérum cependant, traité dans les mêmes conditions, n'agglutine plus que très légèrement les hématies du groupe B.

Nous ne notons que des différences mineures dans le comportement des trois sérums traités par les trois azides isomères. Il est intéressant de signaler la diminution progressive de la taille de l'agglutinat au fur et à mesure que la quantité d'azide mis en jeu augmente.

TABLEAU XXX

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'AZIDE PYRIDINE-MONOCARBOXYLIQUE SUR L'ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE DE SÉRUMS HUMAINS

POIDS D'AZIDE EXPRIMÉ EN mg D'N HÉTÉROCYCLIQUE	SÉRUM B ANTI-A			SÉRUM A ANTI-B			SÉRUM O ANTI-A			SÉRUM O ANTI-B		
	P	N	I	P	N	I	P	N	I	P	N	I
0,945	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1,89	+	++	++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3,98	∓ M	∓ M	∓ L	—	—	—	++	++	++	+	++	++
5,67	—	—	∓ M				+	∓ L	+	∓ M	∓ M	∓ M
6,61							∓ M	—	—	—	—	—
7,48							—					

L'action hémagglutinante d'un sérum témoin dilué au demi et dialysé dans les mêmes conditions correspond à +++ (à l'œil nu); certaines observations ont été réalisées à la loupe (L) ou au microscope (M).
P = picolique; N = nicotique; I = *iso*nicotique.

La localisation propre de chacun de ces anticorps naturels pourrait peut-être expliquer la différence de comportement entre sérum anti-B et anti-A d'une part, anti-A et -B d'autre part. Wurmser et coll. [70] furent les premiers à attirer l'attention sur les différences structurale et énergétique des *iso*hémagglutinines en fonction du groupe sujet donneur. En particulier l'anticorps anti-B d'un sérum O est fait de globulines légères alors que dans un sérum A il s'agit de molécules plus lourdes. Ces travaux ont été repris par de nombreux auteurs. Citons en particulier les récentes recherches de Yokoyama et coll. [176], Hogman et Killander [97] qui ont montré l'hétérogénéité de ces substances spécifiques. Elles seraient formées de trois fractions dont deux possèdent une constante de sédimentation 6, 6 S et migrent comme des γ_2 et γ_1 globulines, la troisième migre comme une γ_1 mais possède une constante de sédimentation de 17,5 S. L'activité agglutinante se trouve principalement au niveau de cette dernière fraction, c'est-à-dire des globulines lourdes, surtout lorsqu'il s'agit des sujets A et B. Tout récemment Killander [107] a montré qu'on pouvait en outre obtenir une fraction intermédiaire possédant une activité hémagglutinante qui serait peut-être une β_{2A} globuline.

Les anticorps lourds et légers ont des propriétés différentes. Pike et Schulze [144] rejoignant en cela les conclusions de Talmage et coll. [162, 163] montrent que le rapport

(*) Nous devons les sérums et les hématies à l'amabilité du Dr. Y. Kane, directeur du centre de transfusion sanguine de Dakar, et du Dr. O. Kane que nous tenons à remercier.

du pouvoir hémolytique/pouvoir agglutinant des sérums normaux est beaucoup plus élevé pour les anticorps macroglobuliniques. On peut donc concevoir que sérum O anti-A et -B à prédominance de γ globulines et sérums A et B de nature principalement macroglobulinique puissent se comporter d'une manière quelque peu différente quant à leur pouvoir hémagglutinant lorsqu'ils ont fixé des groupements pyridiques.

Partie expérimentale

Préparation des antigènes :

Les pyridoylalbumines bovines sont préparées suivant la technique de Clutton telle qu'elle a été précédemment décrite (voir p. 58). Pour l'amino-3-azopyridine albumine bovine nous avons utilisé, à quelques différences près, la technique de Nisonoff et Pressman [137] : diazotation de 90 mg d'amino-3-pyridine avec une solution de $NaNO_2$ 0,2 M en présence d'HCl 2 N et au bain de glace, puis copulation à 5 °C de cette amine diazotée avec 6 g de sérum albumine dans 60 ml de Na_2CO_3 à 30 p. 100. L'azoprotéine est purifiée par dialyse pendant 3 jours contre une solution saline de borate de sodium, de force ionique 0,16 et de $pH = 8{,}00$. La solution est ensuite ajustée avec le tampon borate de façon à obtenir une concentration de 15 mg/ml.

Préparation des anti-sérums

Les lapins (2 ou 3 animaux par antigène) subissent deux séries d'injections par semaine pendant 3, 4 ou 5 semaines suivant l'animal. La quantité injectée dans chaque séance d'immunisation est de 1,5 ml d'une solution renfermant 22,5 mg de l'antigène protéidique, répartis en 12 petites injections intradermiques. La dose totale d'antigène injectée est de 225 mg par animal au maximum. Après contrôle du pouvoir de précipitation, on recueille par ponction intracardiaque environ 30 ml de sang, d'où on isole le sérum.

Micro-immuno-électrophorèse

Nous renvoyons le lecteur à un article récent où les détails techniques sont exposés [119].

L'antigène est déposé dans le puit circulaire à raison de 4 ou 6 μl. Il est nécessaire de faire le dépôt μl par μl en prenant la précaution de laisser diffuser quelques minutes chaque fois. L'électrophorèse est poursuivie pendant une heure en appliquant aux électrodes une différence de potentiel de l'ordre de 6 volts/cm. Après avoir sorti les lames de l'appareil on aspire la bande de gélose découpée à l'aide d'une aiguille, de façon à former une rigole dans laquelle sont déposés 40 μl de l'antisérum étudié. On laisse diffuser douze heures au maximum dans une enceinte humide. Après dix heures de lavage on colore les arcs de précipitation avec la solution de noir amide.

Pour déterminer la localisation des anticorps nous avons placé dans la rigole 40 μl d'antigène et dans le trou 4 μl de sérum. La durée de l'électrophorèse est de deux heures.

Réaction d'Ouchterlony

On recouvre une lame de gélose dans laquelle on découpe des trous disposés de façons diverses suivant l'étude que l'on désire faire. L'un des trous contient l'antigène, l'autre l'anticorps dont on peut faire varier les proportions. Les quantités déposées sont de l'ordre de 4 à 6 μl.

Etablissement des courbes de précipitation des sérums (technique d'Heidelberger)

Des volumes constants d'immunsérums, soit 0,1 ml sont mélangés à des quantités variables d'antigène sous volume final de 0,3 ml. Après contact d'une heure à 37 °C et 24 heures à 3-5 °C, les précipités sont isolés par centrifugation à 5 °C et à 2 400 g. Ils subissent trois lavages avec une solution de chlorure de sodium 0,16 M, sont dissouts dans 1 ml de NaOH 0,1 N et dosés par la technique de Folin-Ciocalteu (voir p. 73).

Réaction de l'antisérum avec l'antigène et le haptène

Les solutions de haptène sont préparées par dissolution dans la quantité de soude 0,1 N permettant d'obtenir une concentration en ion Na^+ de 0,16 M. Dans certains cas il faut arriver à la concentration de 0,22 M en raison de la moindre solubilité des produits. Avant dilution finale les solutions de haptène sont faites avec une solution de chlorure de sodium 0,16 M, celles d'antigène avec un tampon borate de $pH = 8{,}00$, dont la force ionique est de 0,16.

Dans des tubes à hémolyse on ajoute dans l'ordre, 2 ml d'antigène, 0,1 ml de haptène, 0,1 ml de sérum. Après 1 heure de contact au bain-marie à 37 °C et 5 jours à 3-5 °C, des dosages sont effectués sur les précipités centrifugés à 5 °C et 2 400 g, lavés trois fois avec 2,5 ml de la solution de chlorure de sodium 0,16 M. La quantité de précipité est estimée par la technique de Folin-Ciocalteu après dissolution dans 1 ml de NaOH 0,1 N.

Tous les dosages sont faits en double. Nous avons testé deux dilutions pour chaque haptène. Une série d'expériences comporte en outre quatre tubes sans haptène, dont deux sont réservés pour la détermination de la quantité d'azote protéique par micro-Kjeldahl. Les tubes témoins servent de base aux calculs du

degré d'inhibition. Le pourcentage de précipitation est exprimé par rapport à la quantité de précipité obtenue en l'absence de haptène et dosée par micro-Kjeldahl. Nous avons ainsi obtenu pour les témoins :

PSAB-anti-PSAB	250 µg N
NSAB-anti-NSAB	210 µg N
ISAB-anti-ISAB	220 µg N

Dosage d'azote par la micro-méthode de Kjeldahl

Il s'effectue au moyen de l'appareil de Parnas et Wagner.

Les précipités subissent au préalable une minéralisation dans un matras de 50 ml avec le mélange suivant :

H_2SO_4	2 ml
catalyseur	0,5 g environ

Le catalyseur est formé de :

sélénium	3 g
$CuSO_4$	6 g
K_2SO_4	50 g

On chauffe à ébullition avec agitation. Lorsque le liquide est clair on poursuit le chauffage encore une demi-heure et la réaction est alors terminée.

Le dosage proprement dit est effectué selon la technique de Conway. On recueille l'ammoniac déplacé par la lessive de soude, additionnée de phénol-phtaléine, dans 10 ml environ d'une solution de composition suivante :

acide borique	20 g
alcool à 95°	200 ml
indicateur coloré	20 ml
eau distillée q.s.p.	100 ml

L'indicateur utilisé est formé de :

vert de bromocrésol	33 mg
rouge de méthyle	66 mg
alcool à 95°	100 ml

En présence d'ammoniac l'indicateur vire du rose au vert. Le titrage est fait avec une solution de soude 0,02 N jusqu'à coloration rose.

II. — RECHERCHES ENZYMATIQUES

Nous venons de voir que la modification qu'apporte à la molécule de protéine l'introduction de restes d'acides pyridine-carboxyliques amène des propriétés biologiques nouvelles que nous avons explorées dans le domaine immunologique. Nous avons voulu savoir quelles répercussions ce traitement entraînerait pour d'autres propriétés biologiques des protéines. Nous avons réalisé des expériences sur des protéines hormonales et sur des protéines enzymatiques. Nous n'exposerons ici que ces dernières, nos essais sur l'insuline n'étant encore qu'au stade des expériences préliminaires.

Parmi les nombreuses enzymes, nous avons choisi de travailler sur la cholinestérase du sérum; notre choix a été guidé par le matériel dont nous disposions au laboratoire et aussi par le fait que des modifications de l'activité cholinestérasique du sérum ont été décrites sur les patients soumis à un traitement par des tuberculostatiques de nature pyridique [100, 115].

Nos expériences ont été réalisées avec le sérum sanguin total de cheval ou d'homme; nous avons examiné l'influence des trois azides isomères. La préparation des sérums modifiés a été effectuée par la méthode directe. Les rapports nombreux qui existent entre réactions immunologiques et réactions enzymatiques [118] nous ont incitée à donner la préférence à ce mode de préparation plutôt qu'à celui de Clutton et coll. Nous avons déjà signalé les modifications du diagramme électrophorétique du sérum qui accompagnent l'action des azides (voir p. 91).

Le pouvoir cholinestérasique d'un sérum sanguin est caractérisé par la vitesse d'hydrolyse de divers substrats dérivés de la choline, parmi lesquels l'acétylcholine. Les méthode permettant de déterminer quantitativement l'activité de cette enzyme sont nombreuses. Notre choix s'est porté sur deux techniques :

— La méthode titrimétrique de Vincent [169], qui consiste à doser l'acide acétique provenant de l'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase du sérum à étudier. La titration se fait toujours dans des conditions identiques au moyen de NaOH 0,01 N. Les

résultats sont donc exprimés en ml de NaOH ajoutés de 5 en 5 minutes pendant la durée de l'expérience (20 minutes). Cette technique a l'inconvénient de ne pas opérer à pH strictement constant.

— La méthode manométrique utilisée pour la première fois par Ammon [3], méthode basée sur la mesure du volume de CO_2 libéré, se réalise au contraire au sein d'un système bicarbonaté tamponné : l'acide acétique formé au cours de l'hydrolyse de l'acétylcholine entraîne un dégagement de gaz carbonique.

Nous avons opéré sur du sérum humain dans le cas des dosages titrimétriques, sur du sérum humain et du sérum de cheval dans les dosages manométriques (pour la préparation des sérums et les détails techniques, cf. partie expérimentale). Les sérums sont dilués au demi, dilution nécessitée par la préparation des sérums modifiés et par l'adjonction de la solution de substance à étudier. Pour chaque dosage on réalise une lecture témoin. Le traitement des sérums par les azides exigeant une dialyse dont on connaît le rôle défavorable sur la cholinestérase [6], le témoin qui sert à l'étude du comportement de tels sérums est dialysé dans les mêmes conditions. En même temps nous dosons la décomposition spontanée de l'acétylcholine dans nos conditions d'expérience.

Nous ne rapporterons pas ici toutes les expériences qui ont été réalisées. D'une part nous n'avons pas trouvé de différences essentielles entre le pouvoir cholinestérasique d'un sérum humain et celui d'un sérum de cheval, d'autre part aucune influence sensible de l'isomère sur l'activité enzymatique du sérum n'a pu être décelée.

Dans le tableau XXXI nous consignons les influences de la fixation du groupement et des diverses substances étudiées, exprimées en ml de NaOH 0,01N et en unités arbitraires, la valeur 100 ayant été attribuée à l'activité du sérum témoin.

Ce tableau nous permet de constater :
— le pouvoir inactivateur de la simple dialyse;
— une baisse sensible du pouvoir cholinestérasique des sérums sur lesquels ont été fixés des groupements pyridiques;
— l'absence d'action inhibitrice des acides pyridine-monocarboxyliques, des hydrazides et des amides correspondants lorsqu'ils sont libres.

TABLEAU XXXI

POUVOIR CHOLINESTÉRASIQUE D'UN SÉRUM D'HOMME (MÉTHODE DE VINCENT)

PRODUITS ÉTUDIÉS	ml DE SOUDE 0,01 N AJOUTÉS EN 20 MINUTES	POUVOIR CHOLINESTÉRASIQUE EXPRIMÉ EN % DU TÉMOIN
Sérum normal dilué au 1/2, dialysé	2,55	100
Même sérum traité par l'azide	1,85	72,5
Sérum normal dilué au 1/2, non dialysé	3,15	100
Même sérum + acide	3,05	98
Même sérum + hydrazide	3,10	99
Même sérum + amide	3,15	100

Ces résultats ont été systématiquement retrouvés, dans leur allure générale, sur les courbes semi-logarithmiques représentées figure 34 et qui illustrent les expériences réalisées par la méthode manométrique. Les courbes ont cependant l'avantage, sur les résultats des dosages titrimétriques, de mettre en lumière la cinétique de l'hydrolyse qui est suivie pendant 60 minutes.

Signalons la contradiction entre nos résultats et ceux de Bergmann et coll. [13] qui remarquent une inactivation de la cholinestérase par les acides nicotique, picolique et la nicotinamide; les concentrations en inhibiteur utilisées par les auteurs sont, il est vrai, de 3 à 15 fois plus élevées que dans nos expériences. Jacobsohn [100], Levi et Santarato [115] constatent un effet activateur de l'I.N.H. pour cette enzyme, effet que nous n'avons pas plus retrouvé dans nos essais.

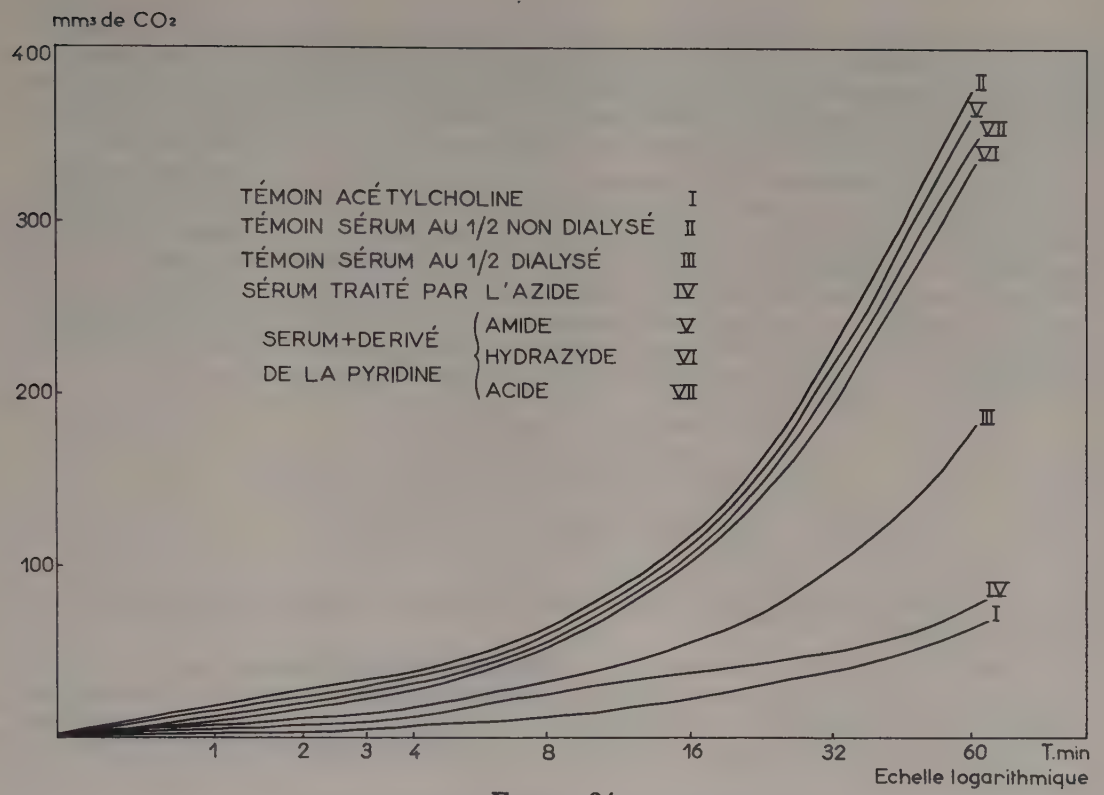


FIGURE 34

Activité cholinestérasique du sérum sanguin de l'homme dans différentes conditions expérimentales. Etude manométrique.

Considérons l'hydrolyse du substrat par le sérum modifié (figure 34, courbe IV). Pendant un laps de temps que nous pouvons évaluer à 10 minutes environ, la courbe suit parallèlement et de très près celle du sérum témoin dialysé (courbe III). L'activité enzymatique ne semble donc pas avoir été inhibée. Puis la courbe s'infléchit et rejoint celle qui exprime l'hydrolyse spontanée du substrat, témoignant ainsi d'une baisse sensible et durable du pouvoir cholinestérasique du sérum.

Pour tenter d'interpréter ces résultats nous allons faire une revue rapide de la localisation de cette enzyme dans le sérum et de la nature de ses groupes actifs (*).

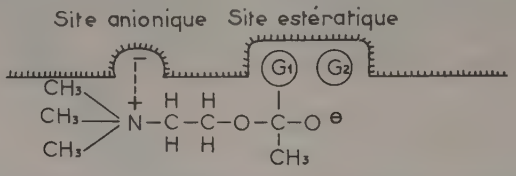
Des méthodes de purification de plus en plus poussée de la cholinestérase ont permis de localiser les fractions protéiques du sérum responsables de son activité enzymatique. C'est ainsi que STEDMAN [159] par des techniques de relargage et d'adsorption isole une pseudoglobuline qui correspondrait à une α-globuline séparée par électrophorèse. MCMEEKIN [122] obtient une enzyme très active à partir de la fraction de protéine précipitée entre 0,33 et 0,50 sat. en sulfate d'ammonium.

GLICK et coll. [78] interprètent ces résultats en admettant que les globulines α et β contiennent beaucoup de cholinestérase et que les γ en possèdent peu; les albumines en seraient complètement dépourvues. Il semble donc que la cholinestérase ne soit pas une enzyme unique; ce fait est vérifié par BERRY [14] qui prouve l'existence d'au moins trois cholinestérases dans le sérum humain; il s'agirait donc d'*iso*enzymes. URIEL [168], par les techniques d'électrophorèse en gel de gélose et grâce au pouvoir d'individualisation très poussé de l'immunoélectrophorèse joint à l'identification de l'enzyme par son activité biologique, a pu dénombrer les constituants enzymatiques du sérum humain. Il a décelé,

(*) On consultera sur ce sujet une revue générale de DESNUELLE [57].

en utilisant comme substrat l'acétate de β-naphtyle, quatre zones d'activité estérasique dont trois seulement E_1, E_3, E_4, qui correspondent approximativement aux zones de migration électrophorétique des fractions ρ (E_1), des α_2 globulines (E_3) et d'une zone intermédiaire entre les α_2 et β_1 globulines (E_4), agissent sur la cholinestérase. Les zones E_1 et E_3 concerneraient des estérases non spécifiques, la zone E_4 la cholinestérase.

L'étude des inhibiteurs et activateurs de la cholinestérase a permis de déterminer la nature des sites actifs de cette enzyme. Bergmann et coll. [173] en particulier distinguent deux centres actifs principaux : un centre anionique possédant une charge négative et qui réagit avec la portion cationique du substrat ou de l'inhibiteur grâce aux forces de Coulomb, et un site estératique qui contient deux groupes actifs, un basique et un autre acide, un des deux se combinant par liaison de covalence avec le carbone électrophile du carboxyle de l'acétylcholine, l'autre pouvant se combiner avec un des deux oxygènes du carbonyle; on peut représenter cette hydrolyse par le schéma ci-dessous :



Les auteurs ne pensent pas que les groupes guanidyle entrent dans la constitution du groupe basique.

Jansz et coll. [102], par fixation du di-isopropyl-fluorophosphate sur la fonction — OH de la sérine qui inhibe l'activité enzymatique du sérum, montrent le rôle important joué par cet acide aminé dans ce domaine (*). La séquence des aminoacides qui entourent la sérine serait très voisine de celle d'autres enzymes, comme la chymotrypsine en particulier [138] :

$$\text{Phe} - \text{Gly} - \text{Glu} - \underset{\displaystyle \text{P}}{\underset{|}{\text{Ser}}} - \text{Ala} - \text{Gly} \; (\text{Ala}_2 - \text{Ser})$$

On pense plutôt à l'heure actuelle qu'aucun reste d'aminoacide, ou qu'aucun fragment d'une chaîne peptidique, ne peuvent être considérés comme sites actifs exclusifs des enzymes. De tels sites impliquent un nombre beaucoup plus important de groupes d'aminoacides séparés par un nombre considérable de liaisons peptidiques, ou appartenant à des chaînes différentes. Les structures secondaire et tertiaire de l'enzyme rapprochent ces groupes les uns des autres : le site actif est ainsi constitué [18].

Comment pourrait-on expliquer dans nos expériences l'inhibition partielle du pouvoir cholinestérasique du sérum ? On peut concevoir que le substrat ne puisse accéder au site actif des enzymes (estérases non spécifiques ou cholinestérase) en raison de l'encombrement stérique créé par la fixation des groupements pyridiques sur l'arginine et la lysine. Ceci est vrai non seulement du site actif au sens restrictif du terme mais aussi des sites environnants auxquels les conceptions actuelles donnent une grande importance.

Reste à préciser la nature exacte du site actif. Plusieurs chercheurs ont pensé y parvenir en étudiant l'action sur l'enzyme de divers acides aminés espérant ainsi réaliser une inhibition de la liaison enzyme-substrat. Les résultats obtenus sont encore très contradictoires.

Aron et coll. [5] ont montré le rôle activateur de l'arginine, de la lysine et de l'histidine, infirmant ainsi les conclusions de Bergmann et coll. [13] qui ont constaté au contraire un rôle inhibiteur très élevé de l'arginine, plus faible de la lysine et nul de l'histidine.

Dobry-Duclaux [60] a attiré l'attention sur le rôle important joué par les groupes amine et imidazole dans l'activité de certaines enzymes en les bloquant par le sel de

(*) Voir aussi [111].

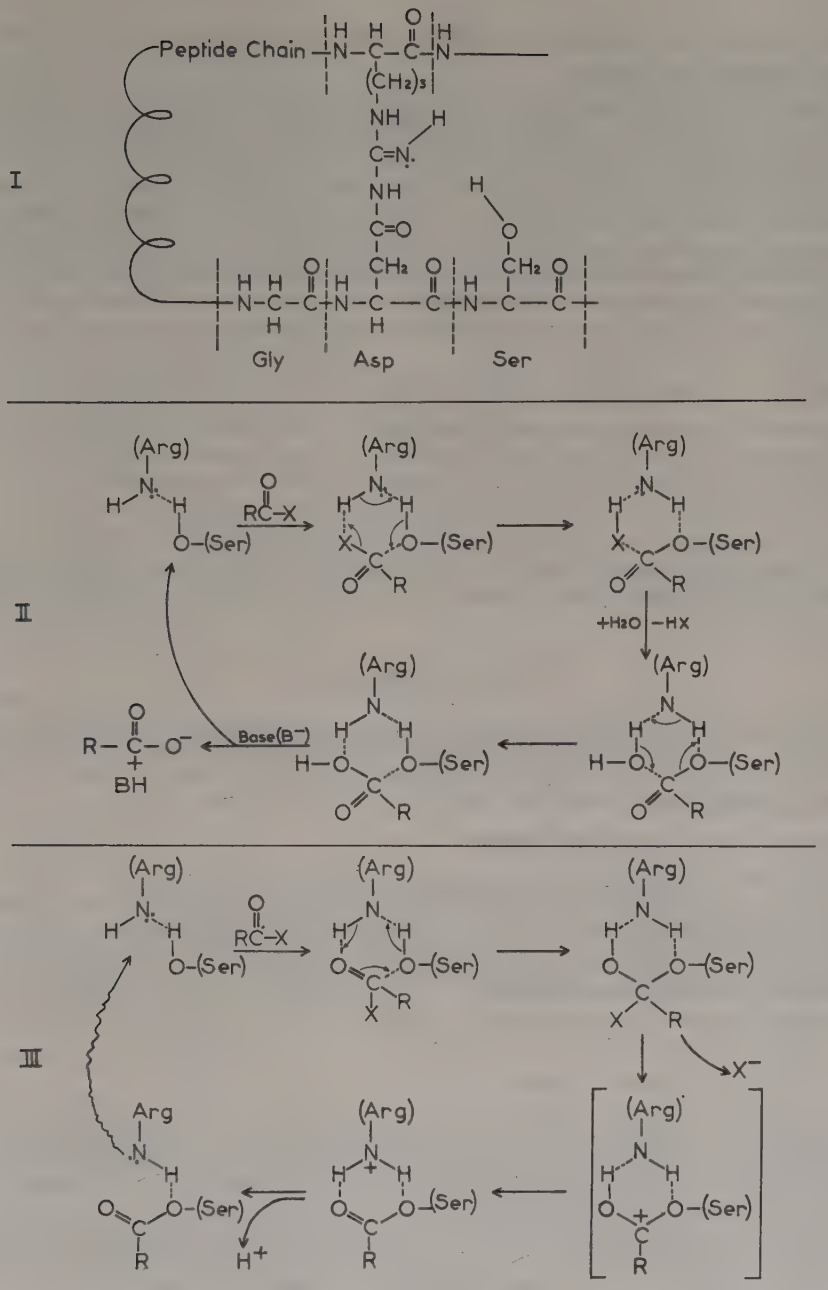


FIGURE 35

Mécanisme des réactions d'hydrolyse enzymatique selon Erlanger.

Roussin ou nitrososulfure de fer (NSF). CUNNINGHAM [44] a proposé un mécanisme d'action des enzymes hydrolytiques telles que la chymotrypsine et l'acétylcholinestérase qui fait intervenir l'histidine. Il pense qu'il y aurait formation d'un centre actif impliquant une liaison hydrogène entre l'OH de la sérine et un noyau d'un groupe imidazole; ces deux résidus peuvent être localisés sur des chaînes séparées de l'enzyme mais à la condition que la structure tertiaire spécifique, formée durant l'activation du zymogène, les rapproche suffisamment pour qu'il y ait interaction. La polarisation de la structure, qui en résulterait, rendrait nucléophile l'oxygène de la sérine qui pourrait alors attaquer

la fonction carbonyle du substrat. Le complexe serait alors stabilisé par un « échange » simultané de liaisons hydrogène.

Récemment enfin ERLANGER [64], tout en n'excluant pas le rôle possible de l'histidine comme le conçoit Cunningham, émet l'hypothèse suivante que nos expériences confirment pleinement : dans le cas d'enzymes hydrolytiques telles que la chymotrypsine où la séquence d'aminoacides gly-asp-ser-gly constitue le centre actif, des changements survenus dans les structures secondaire et tertiaire des enzymes lors de leur activation déterminent une position dans l'espace du groupement guanidique favorable à l'acylation du groupe carboxylique d'un reste d'acide aspartique par le groupement $-NH_2$ libre de l'arginine. Le groupe iminé de l'arginine se trouve alors suffisamment rapproché de l'hydroxyle de la sérine pour former une liaison hydrogène du même type que celle de l'interaction histidine-sérine.

Les différents stades de l'hydrolyse sont donnés dans la figure 35.

L'hypothèse d'Erlanger fait donc jouer dans le mécanisme de l'hydrolyse un rôle capital au groupement guanidique de l'arginine. Or nous avons vu que les azides pyridiques se fixent assez électivement sur deux bases hexoniques des protéines, la lysine et l'arginine. L'inhibition assez marquée que nous observons serait donc due au blocage du groupement guanidique. Cependant cette hypothèse doit rester limitée au cadre de la cholinestérase, car, pour d'autres enzymes hydrolytiques comme la chymotrypsine, le blocage des fonctions aminées par le formol ou le cétène s'avère sans action sur l'activité enzymatique [157].

Partie expérimentale

Quelle que soit la technique de dosage utilisée, les sérums sont traités par les différents azides dans la proportion de 2,83 mg d'N d'hétérocyclique pour 0,15 g à 0,20 g de protéines totales. Ces sérums modifiés sont préparés par action directe de l'azide, amenés après dialyse à un *p*H de 8,00 voisin du *p*H optimal de la cholinestérase et dilués au demi. Le mode de dilution varie suivant le cas.

Dosage titrimétrique par la méhode de Vincent

Les sérums modifiés sont dilués au demi au moyen d'eau physiologique.

Pour étudier l'action de diverses substances telles que les acides pyridine-monocarboxyliques, leurs hydrazides et amides correspondants, le sérum est additionné, avant dilution, d'une quantité de solution de substance à étudier telle que la concentration finale soit de 4×10^{-2} M. Dans tous nos dosages les substances utilisées ont été soigneusement neutralisées dans leur solution aqueuse par NaOH.

On mesure dans deux éprouvettes de 50 ml :

solution extemporanée d'acétylcholine à 2 g p. 1 000	10 ml
solution de rouge de crésol à 0,2 g p. 1 000 (*)	X gouttes
soude 0,1 N	jusqu'au virage au rose
eau distillée récemment bouillie	50 ml

Le contenu des éprouvettes est transvasé dans deux ballons et porté au thermostat à 38 °C. Après 10 minutes l'équilibre de température étant réalisé, on ajoute dans l'un des deux ballons seulement 1 ml de sérum, ainsi qu'une quantité de soude 0,01 N jusqu'à coloration pâle; ceci constitue le temps zéro.

Dans le deuxième ballon on dispose seulement la solution sodique, dans les mêmes conditions, pour déterminer l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine.

Les deux ballons sont replacés au thermostat à 38 °C. A l'aide de deux burettes remplies de soude 0,01 N on fait une affusion de liqueur titrée toutes les 5 minutes en revenant chaque fois à la coloration initiale et cela jusqu'à la 20e minute.

On note le volume total de soude 0,01 N utilisé pour chacun des deux ballons soit :

N ml pour l'essai avec sérum;

n ml pour l'essai à blanc qui correspond à l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine.

L'activité cholinestérasique de sérum sera N — n.

Etude manométrique

Les sérums sont dilués au demi avec de la liqueur de $Ringer_{30}$ dont la composition est la suivante :

NaCl, 0,9 g p. 100	100 ml
Na_2CO_3, 1,26 g p. 100	30 ml
$MgCl_2$, $6H_2O$, 1,76 g p. 100	2 ml

(*) La solution de rouge de crésol est préparée par dissolution de 0,10 g de colorant dans 5,3 ml de soude 0,05 N et complétée à 500 ml avec de l'eau distillée.

Pour étudier la cinétique du dégagement gazeux nous avons utilisé la technique de Warburg dont voici le protocole :

— on introduit dans une fiole de Warburg 0,9 ml d'une solution d'acétylcholine à 1 p. 100 dans de la liqueur de $Ringer_{80}$ et 0,9 ml soit de liqueur de Ringer, soit de solution de la substance à étudier dans du Ringer à la concentration finale de 2×10^{-2} M. Dans la petite nacelle maintenue en place par un aimant on dépose 0,2 ml de sérum dilué au demi, ou 0,2 ml de liqueur de Ringer dans le cas du témoin acétylcholine. Après quinze minutes de séjour dans le bain thermostatique à 37,05 — ± 0,02 °C, on mélange les deux liquides en retirant l'aimant et l'on suit sur le manomètre le dégagement gazeux en fonction du temps, les fioles étant agitées à la cadence de 150 coups par minute, l'amplitude d'oscillation étant 5 cm.

Toutes les expériences ont été réalisées en double.

Le volume étant maintenu constant, le dégagement gazeux se traduit par une ascension de liquide de Brodie dans la colonne de gauche des manomètres. Après avoir effectué la correction thermobarométrique de la dénivellation observée on calcule le volume de CO_2 libéré au moyen de l'équation suivante (*) :

$$V = l \times k$$

V = volume de gaz carbonique dégagé en mm^3;
l = dénivellation en mm, après correction thermobarométrique;
k = constante de la fiole.

La constante de la fiole est elle-même obtenue par la relation :

$$k = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{10\,000}$$

V_g = volume, en mm^3, de l'atmosphère gazeuse dans la fiole d'expérience (volume total de la fiole et du manomètre jusqu'au trait de repère) diminué du volume V (des liquides d'expérience et de la cupule);
T = température absolue;
V_f = volume des fluides utilisés.
α = coefficient de solubilité du gaz libéré dans le liquide d'expérience, en ml de gaz par ml de liquide.

Avec notre protocole :
V_f = 2 000 mm^3;
T = 310,05;
α = 0,570. Nous avons pris la constante de solubilité du gaz carbonique dans l'eau à 37 °C, d'où :

$$k = \frac{(V_g \times 0{,}8805) + 1\,140}{10\,000}$$

CONCLUSIONS DU TROISIÈME CHAPITRE

Le troisième chapitre de notre travail est consacré à l'étude de l'action des azides des acides pyridine-monocarboxyliques sur les protéines. Ce chapitre comprend deux parties, l'une chimique, l'autre biochimique.

*
* *

Après avoir indiqué le mode de préparation des protéines substituées, par une technique dérivée de celle de Clutton et coll. ou par action directe, nous nous sommes attachée au dosage de la quantité de groupements pyridiques fixés sur la sérum-albumine bovine; ces dosages peuvent être réalisés directement sur la protéine traitée, grâce à la réaction colorée de König, ou bien dans le liquide surnageant, grâce à cette même réaction ou par dosage spectrophotométrique. Nous avons montré ainsi que la fixation s'effectue par paliers successifs selon la quantité d'azide mis en jeu; la présence de 30 à 35 restes hétérocycliques par molécule de sérum-albumine bovine est indispensable pour pouvoir réaliser l'isolement isoélectrique de la protéine traitée; nous n'avons pu obtenir de protéine ayant fixé plus de 80 restes hétérocycliques.

Nous avons indiqué les caractéristiques spectrales des protéines modifiées d'où l'on tire une détermination spectrophotométrique des groupements fixés. Nous avons étudié également la solubilité en fonction de la teneur du milieu en sulfate d'ammonium et en fonction du *p*H. Les modifications importantes du *p*H isoélectrique observées rendent compte du comportement électrophorétique qui accuse une augmentation considérable de la vitesse de déplacement dans le champ électrique.

(*) Pour plus de détails sur la technique manométrique consulter l'ouvrage de Umbreit et coll. [167].

Nous avons enfin précisé le lieu de fixation des groupements pyridiques, des déterminations globales des fonctions acides et basiques des protéines, effectuées grâce à la méthode de Fraenkel-Conrat nous ayant indiqué la participation très importante des groupements aminés. Nous avons confirmé ce point en montrant l'inaptitude de la sérum-albumine bovine désaminée à fixer les restes d'acide pyridine-carboxylique et surtout en identifiant les aminoacides touchés par l'action des azides pyridiques; cette analyse a été réalisée après hydrolyse enzymatique de la protéine par la technique chromatographique. La lysine et l'arginine apparaissent responsables de la presque totalité des groupements hétérocycliques introduits dans la molécule.

*
* *

Les modifications qu'entraîne l'action des azides pyridiques sur le plan des propriétés biologiques des protéines ont été examinées dans le domaine immunologique et enzymatique.

Nous avons injecté à l'animal différentes protéines substituées par des restants d'acides picolique, nicotique ou *iso*nicotique; les immunsérums ainsi obtenus donnent non seulement une réaction de précipitation avec les antigènes qui ont servi à leur préparation, mais encore toute une série de réactions croisées qui nous ont permis d'étudier l'influence antigénique du groupement introduit, l'influence de la position spatiale du noyau pyridique, l'influence du mode de liaison à la protéine de la structure hétérocyclique. Nos expériences ont porté à la fois sur la réaction de précipitation en milieu gélosé, en mettant en œuvre la technique de micro-électrophorèse de Scheidegger ou la méthode de diffusion d'Ouchterlony, et en milieu liquide (technique d'Heildelberger). Nous avons également réalisé des essais d'inhibition hapténique.

Nous pensons que les modifications du pouvoir antigénique proviennent non seulement de la présence du noyau pyridique fixé, mais dépendent aussi de la liaison amide par laquelle le groupement pyridique se trouve lié à la molécule de protéine. Signalons encore la suppression presque complète des propriétés anticorps d'un immunsérum par action des azides pyridiques, comme nous l'ont prouvé les expériences effectuées avec plusieurs couples précipitants et des expériences d'*iso*agglutination d'hématies.

Dans le domaine enzymatique nous avons limité nos recherches à l'activité cholinestérasique du sérum sanguin de l'homme et du cheval. Par la technique titrimétrique comme par la technique manométrique nous avons montré une inhibition importante de l'activité hydrolytique de l'enzyme, tandis que différentes substances de structure pyridique — libres et non liées à des protéines — s'avèrent complètement dépourvues de toute influence sur l'enzyme. Nous expliquons les résultats observés par des modifications du site actif de l'enzyme, selon les conceptions d'Erlanger.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce travail, consacré à l'étude des azides des acides pyridine-monocarboxyliques (azides picolique, nicotique et *iso*nicotique) auxquels les propriétés labiles de leur fonction — N_3 confèrent un intérêt spécial tant du point de vue physicochimique que biochimique, se subdivise en trois parties.

Chapitre I

Dans le premier chapitre nous rappelons la préparation des azides pyridine-monocarboxyliques. La synthèse de ces substances s'effectue par l'intermédiaire de l'hydrazide correspondant, lui-même obtenu à partir de l'ester.

Nous avons ensuite étudié, en lumière ultra-violette, les spectres des azides pyridiques ainsi que ceux de leurs acides correspondants. En comparant les spectres des acidylazides de la série pyridique à celui de l'azoture de sodium et à celui du benzazide, qui dérive des azides pyridiques par remplacement du noyau hétérocyclique azoté par le noyau benzénique, nous avons montré que l'introduction d'un groupement — N_3 dans la molécule d'acide se manifeste par une hyperchromicité généralisée, avec apparition d'un maximum nouveau tout au moins pour le dérivé γ. L'hyperchromicité dans les plus faibles longueurs d'onde est caractéristique du groupement — N_3 lui-même. L'apparition d'un deuxième maximum et l'augmentation importante de l'absorption vers les plus fortes longueurs d'onde seraient attribuées aux interactions entre les formes de résonance du groupement — N_3 et celles des noyaux aromatiques ou hétéroaromatiques. Le groupement — N_3 est donc lié à la molécule non comme un simple groupement mais faisant avec elle un ensemble susceptible de donner naissance à des niveaux énergétiques nouveaux.

La détermination des spectres a servi de base expérimentale à l'étude cinétique de la réaction d'hydrolyse des azides pyridiques en milieu alcalin. Nous avons pu vérifier par chromatographie que la réaction était totale. La réaction d'hydrolyse répond à la loi du premier ordre par rapport à l'azide. Nous avons établi pour les trois azides isomères les constantes de vitesse d'hydrolyses aux températures de 22° - 30° - 37° C dans la gamme des *p*H allant de 8,00 à 9,00. L'augmentation de la constante de vitesse en fonction du *p*H suggère une catalyse par les ions OH^-. Nous avons pu ainsi établir les constantes de catalyse basique (k_1) qui sont particulièrement élevées en comparaison de celles des amides pyrdiques correspondantes. En définitive l'ordre global de la réaction d'hydrolyse est deux et l'on peut écrire que la vitesse d'hydrolyse est de la forme :

$$v = k_1 \ [OH^-] \ [\text{azide}]$$

La loi de vitesse observée nous a permis de proposer un mécanisme de la réaction d'hydrolyse. Nous avons remarqué en outre l'influence notable de l'isomérie sur les constantes d'hydrolyse et de catalyse qui vont en augmentant de l'isomère β à l'isomère α, puis γ. La réactivité dans l'ensemble très élevée des trois isomères vis-à-vis des ions OH^- et les différences observées de vitesse dans l'hydrolyse des trois azides s'expliqueraient sur les bases des structures de résonance du groupement — N_3 et des noyaux hétérocycliques qui exalteraient le pouvoir électrophile du carbone du groupement carbonyle.

Chapitre II

Nous exposons dans le deuxième chapitre le résultat de notre étude de l'action des azides pyridiques sur les acides aminés. L'affinité de ces dérivés pour la fonction amine a retenu tout d'abord notre attention. Nous avons montré, par une technique chromatographique, que la réactivité des azides pour un acide aminé tel que le glycocolle dépend de la position spatiale du noyau par rapport au groupement fonctionnel. Les vitesses de condensation sont très élevées pour l'azide picolique, elles diminuent pour l'isomère γ et surtout β. Elles sont en outre plus fortes que les vitesses d'hydrolyse des azides. La présence dans le milieu réactionnel des ions OH^- et d'une fonction acide dans le dérivé aminé est indispensable pour que la condensation se produise.

Après avoir décrit la préparation de trois nouveaux N-*iso*nicotyl-aminoacides et donné leurs caractéristiques spectrales et chromatographiques, nous avons montré que ces composés ne sont pas doués de propriétés tuberculostatiques notables. Puis nous avons consacré de nombreux essais à l'étude de leur utilisation par les germes bactériens dont le développement sur milieu synthétique exige une source d'azote sous forme de sels ammoniacaux ou d'acides aminés : le blocage de la fonction amine par le groupement pyridique empêche toute culture de germes. La désamination semble donc être le stade initial de transformation de l'acide aminé par la bactérie.

Chapitre III

Le troisième chapitre est consacré à nos recherches sur l'incidence de la fixation de groupements pyridiques sur quelques propriétés des protéines.

Après avoir rappelé le mode de préparation des protéines qui s'effectue à froid et en milieu alcalin, nous avons déterminé le nombre de résidus hétérocycliques introduits dans la molécule protéique et les acides aminés qui les supportent. C'est ainsi que nous avons montré qu'une albumine bovine fixait un maximum de 80 groupements par molécule. La fixation se fait, par paliers progressifs, sur les fonctions amine et électivement sur la lysine et l'arginine qui représente 79 des charges positives sur un total de 97 que possède la molécule d'albumine bovine. Le blocage de ces fonctions confère aux protéines des propriétés physicochimiques très différentes de celles de l'albumine bovine native : spectre dans l'ultra-violet présentant le maximum caractéristique de l'acide correspondant au groupement fixé, précipitation à un degré de saturation en sulfate d'ammonium variant de 45 à 30 p. 100 suivant le nombre de résidus introduits, abaissement très sensible du point isoélectrique, augmentation très nette de la mobilité électrophorétique.

Nous nous sommes consacrée ensuite à l'étude des modifications qu'entraîne l'action des azides pyridiques sur le plan des propriétés biologiques des protéines. Des investigations ont été réalisées dans les domaines immunologique et enzymatique.

Nous avons préparé des immunsérums en injectant au lapin différentes protéines substituées par des restants d'acides picolique, nicotique ou *iso*nicotique ainsi qu'une azoprotéine à substituant pyridique préparée selon la technique de Landsteiner. Tous les immunsérums donnent, non seulement une réaction de précipitation avec les antigènes correspondants, mais également une série de réactions croisées qui nous ont permis d'étudier l'influence antigénique du groupement introduit, l'influence, sur la réponse de l'organisme, de la position spatiale du noyau pyridique et le rôle primordial du mode de liaison à la protéine du groupement dans le déterminisme de la spécificité. L'étude de l'inhibition hapténique, selon la technique d'Heidelberger, a permis de vérifier les résultats obtenus par la réaction de précipitation en milieu gélosé (technique de microimmunoélectrophorèse et technique de diffusion). Signalons enfin que la fixation de groupements pyridiques à un sérum modifie ses propriétés d'*iso*hémagglutination et le cas échéant son pouvoir anticorps acquis.

Dans le domaine enzymatique nous avons porté nos efforts sur l'étude du pouvoir cholinestérasique du sérum sanguin de l'homme et du cheval. Par des méthodes titrimétrique et manométrique nous avons montré une inhibition importante des propriétés enzymatiques d'un sérum lorsqu'il a été traité par les azides pyridine-monocarboxyliques, différentes substances de nature pyridique libres et non liées à la protéine restant sans effet. Nous expliquons ces résultats par des modifications du site actif de l'enzyme selon les conceptions d'Erlanger.

*

BIBLIOGRAPHIE

[1] Acher (R.) et Crocker (Ch.). — Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. *Biochim. biophys. Acta*, 1952, **9**, 704-705.

[2] Ackermann (D.). — Uber das Vorkommen von Trigonellin und Nikotinursaüre im Harn nach Verfütterung von Nikotinsaüre. *Z. f. Biologie*, 1913, **59**, 17-22.

[3] Ammon (R.). — Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Arch. ges. Physiol.*, 1933, **233**, 486-491.

[4] Anderson (T.). — On the constitution and properties of picoline, a new organic base from coal-tar. *Trans. roy. Soc. Edin.*, 1846, **16**, 123-136.

[5] Aron (E.), Herschberg (A.D.) et Frommel (E.). — Influence des acides aminés sur la cholinestérase. *Helv. physiol. Acta*, 1944, **2**, 495-505.

[6] Augustinsson (K. B.). — In Summer (J. B.) et Myrbäck (K.). — Acetylcholinesterases and other cholinesterases, vol. 1, part. 1, 443-469. — In the enzymes chemistry and mecanism of action. 2 vol. 1361, 1440 p. Acad. Press Inc. ed. New York, 1950.

[7] Baraud (J.). — Dosage iodométrique de l'azote aminé libre des protéines par l'intermédiaire des dérivés dithiocarbamiques. *Bull. Soc. chim.*, 1957, 948-953.

[8] Barnes (R. A.), Brody (F.) et Ruby (P. R.). — The heterocycle compounds pyridine and its derivatives. Part one. 613 p. interscience publishers inc. New York. Klinsberg ed. A series of monographes A. Weissberger, 1960.

[9] Benedict (A. A.), Brown (R. J.) et Ayengar (R.). — Physical properties of antibody to bovine serum albumin as demonstrated by hemagglutination. *J. exp. Med.*, 1962, **115**, 195-208.

[10] Berger (E.). — Uber Antikörper gegen Aminothiazol. *Schweiz med. Worch.*, 1941, **71**, 1376-1377.

[11] Berger (E.) et Erlenmeyer (H.). — Versuche über die Neutralisation der Wirkung eines Haptens durch den Antikörper in Organismus. *Giorn. Batt. Immunol.*, 1934, **13**, 412-419.

[12] Berger (E.) et Erlenmeyer (H.). — Immunochemische Untersuchungen über Pyridin und Pyridinderivate. *Klin. Woch*, 1935, **14**, 536-537.

[13] Bergmann (F.), Wilson (I. B.) et Nachmansohn (D.). — Acetylcholinesterase IX. Structural features determining the inhibition by aminoacids and related compounds. *J. biol. Chem.*, 1950, **186**, 693-703.

[14] Berry (W. K.). — Cholinesterases in human serum. *Biochim. biophys. Acta*, 1960, **39**, 346-348.

[15] Berstein (J.), Lott (W. A.), Steinberg (B. A.) et Yale (H. L.). — Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazid (nydrazid) and related compounds. *Am. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 357-364.

[16] Block (J.) et Weiss (K. W.). — Aminoacid Handbook. 1 vol. 386 p. Ch. Thomas Publish. Springfield, Illinois, U. S. A., 1956.

[17] Bonnemay (M.) et Verdier (E. T.). — Sur l'absorption dans l'ultraviolet de solutions d'azoture de sodium et d'acide azothydrique. *C.R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 228-230.

[18] Boyer (P. D.). — Mécanisme of enzyme action. *Ann. Rev. Biochem.*, 1960, **29**, 15-44.

[19] Broche (A.). — Cinétique de l'aldolisation (acétaldéhyde). *Bull. Soc. chim.*, 1955, 131-135.

[20] Broche (A.) et Gibert (R.). — Etude cinétique de l'aldolisation. II. Méthode dilatométrique : appareillage. *Bull. Soc. chim.*, 1953, 51-53.

[21] Bruegel (W.). — Die Kernresonanzspektren von Pyridin Derivaten. *Z. Electrochem.*, 1962, **66**, 159-177.

[22] Budesinsky (Z.), Emr (A.), Musil (V.), Perina (Z.) et Zikmunk (E.). — Synthetic antidiabetics III. α-aminoacids and their N-butyl derivatives acylated by pyridin carboxylic acids. *Českolov. Farm.*, 1960, **9**, 179-182.

[23] Buu Hoi (Ng. Ph.) et Gagniant (P.). — *in* Grignard, Traité de chimie organique, **15**, p. 770. Masson et C^ie^ éd., Paris, 1948.

[24] Calmette (A.). — Infection bacillaire et tuberculose, p. 921. Masson et C^ie^, éd., 4^e^ éd., Paris, 1936.

[25] Camain-Giabicani (R.) et Broche (A.). — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet des azides dérivés des acides pyridine-monocarboxyliques. A paraître dans *Ann. Fac. Sciences Dakar* t. 16.

[26] Camain-Giabicani (R.) et Broche (A.). — Etude cinétique de l'hydrolyse des azides. I. Azides dérivés des acides pyridine-monocarboxyliques. *Bull. Soc. chim.*, 1964, 1254-1258.

[27] Cann (J. R.) et Clark (E. W.). — Kinetics of the antigen-antibody reaction. Effect of salt concentration and pH on the rate or neutralisation of bacteriophage by purified fractions of specific antiserum. *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 3627-3631.

[28] Carrara (G.), d'Amato (V.), Rolland (G.) et Fusarpoli (E.). — Sintesi di analoghi dell'idrazide dell' acido isonicotino e loro proprièta antitubercolari. *Gazz. chim. Ital.*, 1953, **83**, 459-475.

[29] Cesaire (O. G.), Boiron (H.) et Neuzil (E.). — Chromogénèse de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu synthétique. *C.R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1427-1430.

[30] Cesaire (O. G.), Neuzil (E.) et Boiron (H.). — Recherche sur le métabolisme azoté microbien. I. Métabolisme des aminoacides par *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1958, **40**, 1435-1446.

[31] Cesaire (O. G.), Neuzil (E.) et Boiron (H.). — Recherches sur le métabolisme azoté microbien. III. Métabolisme des aminoacides par *Salmonella paratyphi* B. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1958, **40**, 1447-1452.

[32] Cesaire (O. G.), Neuzil (E.), Boiron (H.) et Lecomte (M.). — Biosynthèse de l'azote aminé par *Pseudomonas aeruginosa* et par *Salmonella paratyphi* B. *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 1167-1171.
[33] Chapman (L. M.), Greenberg (D. M.) et Schmidt (C. L. A.). — Studies on the nature of the combination between certain acid dyes and proteins. *J. biol. Chem.*, 1927, **72**, 707-729.
[34] Chapman-Rawlins (L. M.) et Schmidt (C. L. A.). — The mode of combination between certain dyes and gelatine granules. *J. biol. Chem.*, 1930, **88**, 271-284.
[35] Chorine (V.). — Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium*. *C.R. Acad. Sc.*, 1945, **220**, 150-151.
[36] Chow (B. F.). — The purification and properties of certain protein hormones. *Adv. in Prot. Chem.*, 1944, **1**, 153-185. Acad. Press, inc. New-York.
[37] Chow (B. F.) et Goebel (W. F.). — The purification of the antibodies in type I anti-*Pneumococcus* serum, and the chemical nature of the type-specific precipitin reaction. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 179-201.
[38] Clutton (R. F.), Harington (C. R.) et Yuill (M. E.). — Studies in synthetic immunochemistry II. Serological investigation of O-β-glucosidotyrosyl derivatives of proteins. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1111-1118.
[39] Cohen (M. B.) et Friedman (H.). — Antibodies to histamine induced in human beings by histamine conjugates. *J. Allergy*, 1943, **14**, 195-202.
[40] Cohen (G. N.) et Hirsch (M. L.). — Threonine synthase, a system synthesizing L-threonine from L-homoserine. *J. Bacteriol.*, 1954, **67**, 182-190.
[41] Coleman (R. A.), Newman (M. S.) et Garrett (A. B.). — Acid catalysis in the decomposition of benzazides. *J. amer. chem. Soc.*, 1954, **76**, 4534-4538.
[42] Colour Index. — 4 vol., 4584 p., 2e éd. 1956. The society of dyers and colourist. Dean house Piccadilly Bradford Yorkshire England. The american association of textile chemists and colorists. Lowell technologie Inst. Lowell Mass U.S.A.
[43] Conn (H. J.). — Biological stains. 1 vol. 367 p. Geneva N. Y., 1953.
[44] Cunningham (L. W.). — Proposed mechanism of action of hydrolytic enzymes. *Science*, 1957, **125**, 1145-1146.
[45] Curtius (Th.). — Uber Stickstoffwasserstoffsaüre (Azoimid) N_3H. Ber., 1890, **23**, 3023-3033.
[46] Curtius (Th.). — Hydrazide und Azide organischer Saurën-über Benzazid und einige Saüreazide der Fettreihe. *J. prakt. Chem.*, 1895, **52**, 210-226.
[47] Curtius (Th.). — Synthetische Versuche mit Hippurazid. *Ber.*, 1902, **35**, 3226-3228.
[48] Curtius (Th.). — Lorenzen (F.). — Hydrazide und Azide organischer Saüren-Hydrazide und Azide aromatischer Sulfosaüren. *J. prakt. Chem.*, 1898, **58**, 160-188.
[49] Curtius (Th.) et Mohr (E.). — Uberführung von Nicotinsaüre in β-Amidopyridin. *Ber.*, 1898, **31**, 2493-2495.
[50] Curtius (Th.) et Rissom (J.). — Neue Untersuchungen über den Stickstoffwasserstoff N_3H. *J. prakt. Chem.*, 1898, **58**, 261-309.
[51] Curtius (Th.) et van der Linden (Ch. F.). — Verkettung von α-Alanin und Glycin durch Alaninazid. *J. prakt. Chem.*, 1904, **70**, 137-157.
[52] Cuthbertson (N. F. J.), Ireland (D. M.) et Wolff (W.). — Detection and identification of some metabolites of isonicotinic acid hydrazid (isoniazid) in human urine. *Biochem. J.*, 1953, **55**, 669-671.
[53] Dagley (S.), Dawes (E. A.) et Morrison (G. A.). — Production of amino acids in synthetic media by *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*. *Nature*, 1950, **165**, 437-438.
[54] Defranceschi (A.) et Zamboni (W.). — Sul dosaggio dell' idrazide dell' acido isonicotinico. *Giorn. Biochim.*, 1952, **5**, 405-416.
[55] Deltombe (J.). — Etude analytique du groupe de l'acide nicotique. *J. Pharm. Belg.*, 1953, **35**, 59-75.
[56] Dennis (L. M.) et Browne (A. W.). — Hydronitric acid and the inorganic trinitrides. *J. amer. chem. Soc.*, 1904, **26**, 577-612.
[57] Desnuelle (P.). — Faits expérimentaux et hypothèses sur la structure et la formation du centre catalytique des estérases. *Cahiers Phys.*, 1960, **124**, 482-496.
[58] Dimroth (O.). — Uber eine Synthese von Derivativen des 1, 2, 3 Triazols. *Ber.*, 1904, **35**, 1029-1038.
[59] Dimroth (O.). — Synthesen mit Diazobenzolimid. *Ber.*, 1904, **35**, 4041-4060.
[60] Dobry-Duclaux (A.). — Sur la détermination de sites actifs de certaines enzymes au moyen d'un nouveau réactif spécifique, le sel de Roussin. I et II. *Biochim. biophys. Acta*, 1960, **39**, 33-52.
[61] Doub (L.) et Vandenbelt (J. M.). — The ultraviolet absorption spectra of simple unsatured compounds. I. Mono- and *p*-disubstituted benzenes derivatives. *J. amer. chem. Soc.*, 1947, **69**, 2714-2723.
[62] Edsall (J. T.). — Structure et fonction de la sérum-albumine. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1956, **18**, 87-110.
[63] Epstein (S. I.) et Singer (S. J.). — Physical studies of soluble antigen-antibody complexes. IX. The influence of pH on the association of a divalent hapten and antibody. *J. amer. chem. Soc.*, 1958, **80**, 1274-1283.
[64] Erlanger (B. F.). — A possible role for arginine in enzyme mechanisms. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1960, **46**, 1430-1437.
[65] Erlenmeyer (H.) et Berger (E.). — Uber immunochemische Untersunchungen in der Pyrazolon-Reihe. *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.*, 1934, **177**, 116-118.
[66] Erlenmeyer (H.), Berger (E.) et Martin (L.). — Beziehungen zwischen der Struktur der Antigen und der Antikörper. *Helv. chim. Acta*, 1933, **16**, 733-738.
[67] Evans (R. F.), Herington (E. F. G.) et Kynaston (W.). — Determination of dissociation constants of the pyridine-monocarboxylic acids by ultraviolet photoelectric spectrophotometry. *Trans. Faraday Soc.*, 1953, **49**, 1284-1292.
[68] Fabre (R.), Truhaut (R.) et Herbert (M.). — Toxicologie de la pyridine. I. Détermination dans l'atmosphère en milieu biologique. *Ann. pharm. franç.*, 1950, **12**, 773-788.

[69] Favini (G.). — Struttura electronica e velocita' di reazione in derivati della piridina. *Rend. Ist. lombardo*, 1957, **91**, 162-169.
[70] Filiti-Wurmser (S.), Aubel-Lesure (G.) et Wurmser (R.). — III. Constantes de sédimentation des isoagglutinines β ($A_2$0), β (00) et β (A_1A_2). *J. Chim. phys.*, 1953, **50**, 236-239.
[71] Fischer (E.) et Otto (K.). — Synthese von Derivativen einiger Dipeptide. *Ber.*, 1903, **34**, 2106-2116.
[72] Fox (S. W.) et Field (H.). — The synthesis of nicotinuric acid. *J. biol. Chem.*, 1943, **147**, 651-652.
[73] Fraenkel-Conrat (H.) et Cooper (M.). — The use of dyes for the determination of acid and basic groups in proteins. *J. biol. Chem.*, 1944, **154**, 239-246.
[74] Gallet (P.). — Recherches sur la chromatographie de partage des colorants de synthèse. Etude particulière des dérivés du xanthène. Thèse Pharmacie Bordeaux, n° 439, 1962, 154 p. Imp. Drouillard, Bordeaux.
[75] Gardner (Th. S.), Wenis (E.) et Lee (J.). — The synthesis of compounds for the chemotherapy of tuberculosis. IV. The amide function. *J. org. Chem.*, 1954, **19**, 753-757.
[76] Genevois (L.). — Le maïs et la pellagre. *J. Agr. trop. Bot. appl.*, 1961, **8**, 221-228.
[77] Giabicani (R.). — Essais sur la biologie des microorganismes. Thèse Pharmacie, Nancy, 1945, n° 52, 223 p. Imp. Soc. d'impressions typographiques, Nancy.
[78] Glick (D.), Glaubach (S.) et Moore (D. H.). — Azolesterase activities of electrophoretically separated proteins of serum. *J. biol. Chem.*, 1942, **144**, 525-528.
[79] Goebel (W. F.) et Avery (T.). — Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate proteins. I. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. exp. Med.*, 1929, **50**, 535-550.
[80] Goldie (H.) et Sandor (G.). — Influence du cétène sur le pouvoir floculant du sérum antidiphtérique. *C.R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 974-977.
[81] Gombert (J.). — Contribution à l'étude des anticorps au cours de la trypanosomiase africaine à *T. gambiense*. Thèse Médecine, Toulouse, 1963, n° 56, 154 p. Imprimerie toulousaine.
[82] Grammaticakis (P.). — Remarques sur l'absorption dans l'ultraviolet moyen de quelques aryl- et aroylazides. *C.R. Acad. Sc.*, 1957, **244**, 1517-1519.
[83] Grant (R. A.). — The inhibition by dioxane of antigen antibody precipitation. I. Precipitation reactions with protein antigens. *Brit. J. exp. pathol.*, 1959, **40**, 551-558.
[84] Green (R. W.) et Tong (H. K.). — Constitution of the pyridin monocarboxylic acids in their isoelectrics forms. *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 4896-4900.
[85] Griess (P.). — Uber eine neue Klasse organischer Verbindungen, in deren Wasserstoff durch Stickstoffvertreten ist. *Ann. Chem. Pharm.*, 1866, **137**, 39-91.
[86] Grollman (A.). — The combination of phenol red an proteins. *J. biol. Chem.*, 1925, **64**, 141-160.
[87] Grunberg (E.) et Schnitzer (R. C.). — Studies on the activity of hydrazine derivatives of *isonicotinic* acid in the experimental tuberculosis of mice. *Quart. Bull. Sea View Hosp.*, 1952, **13**, 3-11.
[88] Harte (R. A.). — Serological tests with pyrazolone compounds. *J. Immunol.*, 1938, **34**, 433-439.
[89] Haurowitz (F.). — Immunochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 1960, **29**, 609-634.
[90] Heidelberger (M.), Grabar (P.) et Treffers (H. P.). — Quantitative studies on antibody purification. III. The reaction of dissociated antibody with specific polysaccharide, and the effect of formaldehyde. *J. exp. Med.*, 1938, **68**, 913-921.
[91] Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — A quantitative study of the precipitin reaction between type III *Pneumococcus* polysaccharide and purified homologus antibody. *J. exp. Med.*, 1929, **50**, 809-823.
[92] Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Quantitative studies on the precipitin reaction. The determination of small amounts of a specific polysaccharide. *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 555-561.
[93] Heremans (J.). — Les globulines sériques du système γ. 1 vol. 340 p., Arscia ed. Bruxelles, 1960.
[94] Herriott (B. M.). — Reactions of native proteins with chemical reagents. *Adv. in Prot. Chem.*, 1947, **3**, 169-225.
[95] Herriot (B. M.) et Northrop (J. H.). — Crystalline acetyl derivatives of pepsin. *J. gen. Physiol.*, 1934, **18**, 35-67.
[96] Hill (R. L.) et Schmidt (W. R.). — The complete enzymic hydrolysis of proteins. *J. biol. Chem.*, 1962, **237**, 389-395.
[97] Hogman (C. F.) et Killander (J.). — The reactivity of blood group A isoantibodies fractioned by D E A E - chromatography and gel filtration in the " mixed agglutination and serological adhesion " test. *Acta path. microbiol. scand.*, 1962, **55**, 357-364.
[98] Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — Antibodies to strychnine. *J. Immunol.*, 1940, **38**, 479-490.
[99] Huebner (Ch. F.). — Paper chromatography of pyridine derivatives. *Nature*, 1951, **167**, 119-120.
[100] Jacobson (K. P.). — Action de l'hydrazide *isonicotique* sur plusieurs enzymes animaux. *Soc. port. Biol.*, 1953, 2e série B, vol. II, 81-84.
[101] Jacques (P.). — Contribution à l'étude de l'absorption de la lumière ultraviolette par les acides nicotinique, *isonicotinique* et leurs dérivés. Thèse Pharmacie Strasbourg, 1957, n° 736, 77 p. ronéotypées.
[102] Jansz (H. S.), Brons (D.) et Warringa (M. G. P.). — Chemical nature of the D F P binding site of pseudocholinestérase. *Biochim. biophys. Acta*, 1959, **34**, 573-575.
[103] Javillier (H.), Polonovski (M.), Florkin (M.), Boulanger (P.), Lemoigne (M.), Roche (J.) et Wurmser (R.). — Traité de biochimie générale, tome 1, premier et deuxième fascicules, 1 475 p., Masson et Cie éd., Paris, 1959.
[104] Jellineck (H. H. G.) et Urwin (J. R.). — Ultraviolet absorption spectra and dissociation constants of picolinic, *isonicotinic* and their amides. *J. phys. Chem.*, 1954, **58**, 548-550.
[105] Jones (A. W.) et Holtman (D. F.). — Synthesis of glutamic acid and alanine by *Salmonella pullorum*. *J. Bact.*, 1953, **66**, 147-149.
[106] Kanda (T.), Saito (Y.) et Kawamura (K.). — Nuclear magnetic resonance of azides. *Bull. chem. Soc. Japan*, 1962, **35**, 172-173.

[107] KILLANDER (J.). — Fractionation of antibodies of 19 S, 7 S and " intermediate " type by gel filtration and ion-exchange chromatography or preparative electrophoresis. *Communication au XI^e Colloque sur les protides des liquides biologiques.* Bruges, mai 1963.

[108] KISS (A. I.) et MUTH (B. R.). — Action of elements of main group VI of the periodic system on the light absorption of organic compounds I. spectroscopic investigation of aromatic heteroatoms in side chains. *Acta chim. Sci. Hungar,* 1955, **7**, 373-384.

[109] KODICEK (E.) et REDDI (K. K.). — Paper chromatography of nicotinic acid derivatives. *Nature,* 1951, **168**, 475-477.

[110] KONIG (W.). — Uber eine neue vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen. *J. prakt. Chem.,* 1904, **69**, 105-137.

[111] KRUPKA (R. M.) et LAIDLER (I. K.). — Molecular mechanisms for hydrolytic enzyme action. I, II, III et IV. *J. amer. chem. Soc.,* 1961, **83**, 1445-1447, 1448-1454, 1454-1458, 1458-1460.

[112] KUSHNER (S.), DALALIAN (H.), CASSEL (R. J.), SANJURJO (J. L.), MC KENZIE (D.) et SUBBAROW (Y.). — Experimental chemoterapy of tuberculosis. I. Substitued nicotamid. *J. org. Chem.,* 1948, **13**, 834-836.

[113] LANDSTEINER (K.). — The specificity of serological reactions, vol. 1, p. 310. Harvard Univ. Press, 1945.

[114] LANDSTEINER (K.) et PIRIE (N.W.). — Serological specificity in pyridin derivatives. *J. Immunol.,* 1937, **33**, 265-270.

[115] LEVI (A.) et SANTARATO (R.). — Azione dell'idrazide dell'acido isonicotinico sull attivita' colinesterasica e sulla ossidazione del piruvato dei tessuti nervoso ed epatico del siero di sangue. *Farmaco,* 1953, **8**, 342-348.

[116] LOWRY (O. H.), ROSENBROUGH (N. J.), FARR (L.) et RANDALL (R.J.). — Protein measurement with the Folin reagent. *J. biol. Chem.,* 1951, **193**, 265-275.

[117] MARCHAL (J.G.) et MITTVER (T.). — Contribution à l'étude du métabolisme des acides aminés par les bactéries chromogènes. Application à la méthode chromatographique sur papier. *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy,* 1950-1952, **17**, 107-117.

[118] MARRACK (J. R.), SUMMER (J. B.) et MYRBACK (K.). — Enzymes and immunology vol. 1, part. 1, 343-349, in the enzymes chemistry and mecanism of action 2 vol. 1361, 1440 p. Acad. Press Inc. ed. New York, 1950.

[119] MASSEYEFF (R.M.), GOMBERT (J.), TANGUY (U.) et NEUZIL (E.). — Contribution à l'étude biochimique de l'hémocyanine de *Cymbium neptuni.* II. Etude electrophorétique et immunoélectrophorétique. *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1963, **45**, 1133-1144.

[120] MAURER (P. H.), SRI RAM (J.) et EHRENPREIS (S.). — Modified bovine serum albumine II. Immunochemical studies. *Arch. biochim. biophys. Acta,* 1957, **67**, 196-212.

[121] MC KENZIE (D.), MALONE (L.), KUSHNER (S.), OLESON (J.J.) et SUBBAROW (Y.). — The effect of nicotinic acid amid on experimental tuberculosis of white mice. *J. Lab. Clin. Med.,* 1948, **33**, 1249-1253.

[122] MC MEEKIN (T. L.). — Purification of the cholinesterase of serum and the crystallisation of serum albumine. Proc. Am. Soc. Biol. chem., *J. Biol. chem.,* 1939, **128**,IXVI-IXVII.

[123] MELOCHE (I) et LAIDLER (K.J.). — Substituents effects in the acid and base hydrolyses of aromatic amides. *J. amer. chem. Soc.,* 1951, **73**, 1712-1714.

[124] MEYER (H.) et GRAF (R.). — Uber die Kondensation von Pyridin und Cholincarbonsaüren mit Aminosaüren. *Biochem. Z.,* 1930, **229**, 154-163.

[125] MEYER (H.). et MALLY (J.). — Uber Hydrazin derivate der Pyridincarbonsaüren. *Monatsh. Chem.,* 1912, **33**, 393-414.

[126] MULINOS (M. G.) et SCHLESINGER (H.). — Drug allergy : antipyrine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.,* 1936, **35**, 305-307

[127] MULINOS (M. G.), SCHLESINGER (E.) et BLUMENTHAL-STEIN (D.). — Antigenic properties of some azo-compounds of serum albumin and serum globulin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.,* 1937, **37**, 583-587.

[128] MUTSAARS (W.) et GREGOIRE (P. E.). — Comparaison entre les caractères antigéniques des matières protéiques conjuguées à des noyaux aromatiques par des liaisons uréides ou azoïques. *C. R. Soc. Biol.,* 1936, **123**, 144-148.

[129] NEUSS (J. D.), SEAGERS (W. J.) et MADER (W. J.). — The spectrophotometric and polarographic determination of isonicotinic acid hydrazide. *J. amer. pharm. Assoc. Sc. Ed.,* 1952, **41**, 670-673.

[130] NEUZIL (E.). — Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Thèse doctorat médecine, Bordeaux, 1948, n° 24, 300 p., Imprimerie Drouillard, Bordeaux.

[131] NEUZIL (E.), BRETON (J. C.) et PLAGNOL (H.). — La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire. Essai d'interprétation. *Bull. Mem. Ecole Nat. Med. Pharm. Dakar,* 1959, **7**, 195-211.

[132] NEUZIL (E.) et CAMAIN-GIABICANI (R.). — Quelques propriétés immunologiques des isonicotylprotéines. *C.R. Soc. Biol.,* 1962, **156**, 1678-1681.

[133] NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et BRETON (J. C.). — La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire — nouveaux résultats II. *Bull. Mém. Fac. Méd. Pharm. Dakar,* 1960, **8**, 149-185.

[134] NEUZIL (E.) et PAUTRIZEL (P.). — Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de cheval-antisérum de lapin. Etude de la zone d'équivalence. *C.R. Soc. Biol.,* 1947, **141**, 186-188.

[135] NEUZIL (E.) et PAUTRIZEL (P.). — Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de cheval-antisérum de lapin. Influence des proportions variables d'antigène et d'anticorps. *C. R. Soc. Biol.,* 1947, **141**, 188-190.

[136] NEWMAN (M. S.) et GILDENHORN (H. L.). — The mechanism of the Schmidt reactions and observations on the Curtius rearrangements. *J. amer. chem. Soc.,* 1948, **70**, 317-320.

[137] NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). — The annular nitrogen of pyridine as a determinant of immunologic specificity. *J. amer. chem. Soc.,* 1957, **79**, 5565-5572.

[138] Oosterbaan (R. A.), Kunst (P.), van Rotterdam (J.) et Cohen (J. A.). — The reaction of chymotrypsin and diisopropylphosphorofluoridate. I et II. *Biochim. biophys. Acta*, 1958, **27**, 549-563.
[139] Ossorio (R. P.). — Espectros ultravioletas de acidos benzicos alquil substituidos. *Anales real Soc. espan. Fis. y quim.*, 1960, **56 B**, 370-388.
[140] Otsuji (Y.), Furukawa (M.) et Imoto (E.). — Decomposition of the heterocyclic acylazides. *Nippon Kagaku Zasshi*, 1959, **80**, 1307-1309.
[141] Ouchterlony (O.). — Antigen-antibody reactions in gels. *Arkiv. Kemi Mineral. Gol.*, 1949, **26 B**, n° 14, 1-9.
[142] Pauling (L.). — The nature of the chemical bond, p. 271. 3e ed. Cornell un. Press, Ithaca, N. Y. 1960.
[143] Philpott (S. L.) et Small (P. A.). — The action of nitrous acid on pepsin. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 542-551.
[144] Pike (P. M.) et Schulze (M. L.). — The distribution of antibodies for erythrocytes in chromatographic fractions of early and late immunesera. *Immunology*, 1961, **4**, 425-435.
[145] Powell (G.). — The mechanism of the azide rearrangement. *J. amer. chem. Soc.*, 1929, **51**, 2436-2438.
[146] Proom (H.) et Woiwod (A. J.). — Examination, by partition chromotography of the nitrogen metabolism of bacteria. *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 319-327.
[147] Quintin (M.). — Constante de dissociation de l'acide azothydrique. *C.R. Acad. Sc.*, 1940, **210**, 625-627.
[148] Roche (J.) et Michel (R.). — Iodoprotéines thyroïdiennes, protéines iodées par voie chimique et mécanisme de la formation de la thyroxine. *Exp. ann. Soc. Biochim. med.*, 1948, **9**, 127-173.
[149] Rohrlich (M.). — Darstellung der Nicotinursaüre. *Arch. Pharm.*, 1951, **284**, 6-7.
[150] Sah (P. T. T.). — 3-5 dinitro-4-methylbenzazide as a reagent for the identification of phenols. *Rec. Trav. chim.*, 1939, **58**, 8-11.
[151] Sah (P. T. T.) et Chang (L. H.). — *m*-bromobenzazide as a reagent for the identification of amines. *Rec. Trav. chim.*, 1939, **58**, 8-11.
[152] Sah (P.P.T.) et Cheng (P.Y.). — Bromobenzazide as a reagent for the identification of phenols. *Rec. Trav. chim.*, 1938, **59**, 591-594
[153] Sah (P.P.T.) et Chiao (S.H.). — *p*-nitrobenzazide as a reagent for the identification of phenols. *Rec. Trav. chim.*, 1939, **58**, 595-599.
[154] Salvinien (J.). — La réaction antigène-anticorps du point de vue physicochimique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **39**, suppl. n° 1, 11-43.
[155] Scheidegger (J. J.). — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Intern. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1955, **7**, 103-110.
[156] Sheldon (J. M.), Fell (N.), Johnson (J. H.) et Howes (H. A.). — A clinical study of histamine azoproteine in allergic disease. *J. Allergy*, 1941, **13**, 18-30.
[157] Sizer (I. W.). — Essential groups of crystalline chymotrypsin. *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 547-554.
[158] Sri Ram (J.) et Maurer (P. H.). — On the role of free carboxyl groups of bovine serum albumin in the interaction with its antibodies. *Arch. biochim. bioph. Acta*, 1959, **80**, 462-464.
[159] Stedman (E.) et Stedman (E.). — The purification of cholinesterase. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 2563-2567.
[160] Steinbuch (M.), Fine (J. M.) et Battistini (A.). — Etude immuno-électrophorétique de quelques protéines modifiées I. L'albumine sérique humaine. *Clin. chim. Acta*, 1960, **5**, 345-358.
[161] Tabone (J.). — Etude des radicaux acétylés liés aux protéides sériques. Thèse Sciences, Paris 1941, n° 2840, 85 p. Ancienne Imp. de la Cour d'Appel, Paris.
[162] Talmage (D. W.), Freter (G. C.) et Taliafero (W. H.). — The effect repeate injections of sheep red cells on the hemolytic and combining capacities of rabbit antiserums. *J. infectious Diseases*, 1956, **98**, 293-299.
[163] Talmage (D.W.), Freter (G. G.) et Taliafero (W. H.). — Two antibodies of related specificity but different hemolytic efficiency separated by centrifugation. *J. infectious Deseases*, 1956, **98**, 300-305.
[164] Tayeau (F.) et Marquevielle (J.). — Généralités sur les antigènes et les anticorps. La réaction de précipitation antigène-anticorps. *Exp. ann. Biochim. med.*, 1960, **22**, 1-39.
[165] Tchitchibabine (A. E.). — *In* Grignard : Traité de chimie organique, **20**, p. 243. Masson et Cie édit., Paris, 1953.
[166] Thomas (G.). — Contribution à l'étude des chelates métalliques de l'acide picolique. Thèse Sciences, Lyon 1960, n° 253, 131 p., Imp. Louis-Jean, Gap.
[167] Umbreit (W.W.), Burris (R. H.) et Stauffer (J. F.). — Manometric techniques and tissue metabolism. 1 vol., 12e ed., 227 p., Burgess publishing Co ed., Minneapolis 1951, pp. 2-5.
[168] Uriel (J.). — Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. I. Application à l'étude des estérases du sérum humain normal. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 104-119.
[169] Vincent (D.), Segonzac (G.) et de Pratt (J.). — La cholinestérase du sérum, son dosage. Intérêt clinique de son étude. *Ann. Biol. clin.*, 1944, **2**, 35-57.
[170] Waldenstrom (J.). — Incipient myelomatoses or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — new syndrome. *Acta med. scand.*, 1944, **117**, 216-247.
[171] Wheland (G.W.). — Resonance in organic chemistry, p. 160, J. Wiley and sons inc., New-York, London, 1955.
[172] White (A.). — Proteins hormones. *Cold. spring Harbor Symposia quant. Biol.*, 1938, **6**, 262-274.
[173] Wilson (I. B.) et Bergmann (F.). — Acetylcholinesterase VIII. dissociation constants of the active groups. *J. biol. Chem.*, 1950, **186**, 683-692.
[174] Woiwod (A.J.) et Proom (H.). — Identification of characteristic extracellular ninhydrin positive substances produced by some bacteria. *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 501-507.
[175] Wurmser (R.). — L'étude thermodynamique des réactions immunologiques. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1957, **19**, 141-170.
[176] Yokoyama (M.), Finlayson (J. S.), Suchinsky (R.T.) et Roberts (N.F.). — Chemical and serological characteristics of blood group antibodies in the A, B, O and Rh systems. *J. immunol.*, 1961, **87**, 56-63.

[177] Yonemura (T.) et Izuka (M.). — Metabolism of aminoacids in tubercle bacilli. I. Changes of free aminoacids in liquid synthetic media following the growth of bacilli. *Jap. J. Tuberc.*, 1955, **3**, 6-21.
[178] Yoshikawa (T.). — Structure of disodium isonicotinic and hydrazide bis (methane sulfonate). *Yakugaku Zasshi*, 1958, **78**, 479-481.
[179] Yukawa (Y.) et Tsuno (Y.). — The Curtius rearrangement I. The decomposition of *m*- and *p*- substituted benzazides in toluene. *J. amer. chem. Soc.*, 1957, **79**, 5530-5534.
[180] Yukawa (Y.) et Tsuno (Y.). — The decomposition of substituted benzazides in acidic solvents, the acid catalysis. *J. amer. chem. Soc.*, 1959, **81**, 2007-2012.
[181] Zamboni (W.) et Defranceschi (A.). — Identification of isonicotinoyl hydrazones of pyruvic and ketoglutaric acid in rat urine after treatment with isonicotinic acid hydrazide (isoniazid). *Biochim. bioph. Acta*, 1954, **14**, 430-431.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 11

CHAPITRE PREMIER. — Préparation et Propriétés des azides des acides pyridine-monocarboxyliques 13

I. — Préparation des azides pyridine-monocarboxyliques 14

II. — Spectres d'absorption des azides dans l'ultraviolet 15

A. Description des spectres 15

B. Comparaison avec le spectre d'autres azides 18

Partie expérimentale 20

III. — Etude cinétique de l'hydrolyse des azides en milieu alcalin 20

A. Choix de la méthode expérimentale 21

B. Résultats 24

1° Ordre de la réaction 24

2° Les constantes d'hydrolyse, la stabilité des azides 27

C. Mécanisme réactionnel. — Influence de l'isomérie 30

Partie expérimentale 32

Conclusions du chapitre premier 33

CHAPITRE II. — Action des azides pyridine-monocarboxyliques sur quelques aminoacides 35

I. — Action des azides pyridine-monocarboxyliques sur la fonction amine. 35

A. Etude chromatographique de la réaction des azides pyridiques avec le glycocolle 36

B. Essai d'interprétation du mécanisme réactionnel 39

Partie expérimentale 42

II. — Préparation et propriétés physicochimiques de quelques N-isonicotylaminoacides 42

A. Synthèse de quelques N-*iso*nicotylaminoacides 43

B. Spectres d'absorption dans l'ultraviolet 44

C. Identification par chromatographie 45

III. — Essais bactériologiques sur quelques N-isonicotylaminoacides 47

A. Action de quelques N-*iso*nicotylaminoacides sur la pousse du B.C.G. 47

B. Essais sur le métabolisme de quelques N-*iso*nicotylaminoacides par diverses espèces microbiennes 48
1° Protocole expérimental 49
2° Résultats 49
3° Discussion des résultats 55

Conclusions du deuxième chapitre 55

CHAPITRE III. — Action des azides des acides pyridine-monocarboxyliques sur les protéines 57

Section I. — Préparation et propriétés des protéines substituées par des radicaux pyridiques 57

I. — Préparation des protéines substituées 58

II. — Dosage de la quantité de groupements pyridiques fixés sur l'albumine bovine 59
A. Dosage à partir de la protéine 59
B. Dosage de l'excès d'azide dans le surnageant 61
C. Discussion des résultats 65

III. — Propriétés physicochimiques des pyridoylalbumines bovines 66
A. Spectres d'absorption dans l'ultraviolet 67
B. Solubilité en présence de sulfate d'ammonium 70
C. Solubilité en fonction du *p*H 72
D. Mobilité électrophorétique 75

IV. — Lieux de fixation des radicaux pyridiques 76
A. Dosage des fonctions basiques et acides 77
Partie expérimentale 79
B. Action de l'azide *iso*nicotique sur la sérum-albumine bovine désaminée 80
C. Identification des acides aminés bloqués par le groupement pyridique 80

Section II. — Quelques propriétés biologiques des pyridoyl-protéines .. 84

I. — Recherches immunologiques 84
A. Pouvoir antigène des protéines modifiées 85
1° Etude de la précipitation antigène-anticorps 85
2° Etude de l'inhibition hapténique 87
B. Propriétés anticorps des protéines modifiées 90
1° Système précipitant 92
2° Système agglutinant 92
Partie expérimentale 94

II. — Recherches enzymatiques 95
Partie expérimentale 100

Conclusions du troisième chapitre 101

Conclusions générales 103

Bibliographie 107

Table des matières 113

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

BIOSYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS CHEZ LES VÉGÉTAUX

Vu et approuvé :

Bordeaux, le 7 octobre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences

G. BRUS

Vu et permis d'imprimer

Bordeaux, le 9 octobre 1963

Le Recteur

Président du Conseil de l'Université

J. BABIN

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN - GAP
Dépôt légal N° 223 - 1965